

VÍTOR DE GÓES LIMA DANTAS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE VARIAÇÕES DOS GENES *BCHE*  
(BUTIRILCOLINESTERASE) E *GHRL* (GRELINA) COM OBESIDADE**

Dissertação apresentada  
Ao Programa de Pós-Graduação em  
Genética, Área de Concentração em  
Genética, Departamento de Genética,  
Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como  
parte das exigências para a obtenção  
do título de mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Eleidi A.  
Chautard Freire Maia.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo L. R.  
de Souza.

CURITIBA

2008

*“VENI, VIDI, VINCI”*

Julio César

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais e irmãos, que com muito carinho e amor puderam sentir a dor da separação e apoiar-me nas decisões mais importantes da minha vida, além de me ajudarem a viver esse mestrado;

À professora Eleidi A. Chautard Freire Maia, que foi como uma mãe, pela orientação, carinho, apoio e puxões de orelha quando necessário;

Ao professor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, o nosso “irmão mais velho”, pela co-orientação, apoio e amizade e salvamento quando algo dava errado;

Aos colegas de laboratório, Átila, Kelly, Fabiana, Dellyana, Carol, Alejandro, Henrique, que colaboraram para o desenvolvimento da parte experimental do projeto me ensinando e me lembrando várias Metodologias e também pelos momentos divertidos que me proporcionaram ;

Ao HEMEPAR pela concessão das amostras de sangue;

À pessoa mais importante da minha vida, minha noiva linda e maravilhosa, Violene, pelo apoio, carinho, paciência, dedicação e amor.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E SIGLAS .....	XI
RESUMO.....	XIV
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. GENE DA GRELINA – LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA.....	4
2.1.2. ESTRUTURA DA GRELINA .....	6
2.1.2.1. FORMA DES-ACILADA DA GRELINA.....	6
2.1.2.2. DESACILAÇÃO DA GRELINA PELA BUTIRILCOLINESTERASE E OUTRAS ESTERASES .....	7
2.1.2.3. ENZIMA ACIL-MODIFICADORA PARA A GRELINA.....	10
2.1.2.4. DERIVADOS DA GRELINA.....	11
2.1.3. CONCENTRAÇÃO DA GRELINA E DISTRIBUIÇÃO DA GRELINA .....	11
2.1.3.1. CONCENTRAÇÃO .....	11
2.1.3.2. DISTRIBUIÇÃO NO ORGANISMO .....	12
2.1.3.2.1. ESTÔMAGO E ÓRGÃOS GASTROINTESTINAIS .....	12
2.1.3.2.2 CÉREBRO E PITUITÁRIA.....	12
2.1.3.2.3. OUTROS TECIDOS .....	13
2.1.4. RECEPTOR DA GRELINA .....	13
2.1.4.1. ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PARA A GRELINA .....	14
2.1.4.2. DISTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR PARA A GRELINA.....	14
2.1.5. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA GRELINA .....	15
2.1.5.1. ATIVIDADE DE LIBERAÇÃO DO GH .....	17
2.1.5.2. REGULAÇÃO DO APETITE .....	18
2.1.5.3. A GRELINA E A OREXINA .....	19
2.1.5.4. MECANISMOS DE ESTIMULAÇÃO DE APETITE PELA GRELINA .....	20
2.1.5.5. FUNÇÕES GASTROINTESTINAIS .....	21
2.1.5.6. FUNÇÕES CARDIOVASCULARES .....	21
2.1.6. REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE GRELINA .....	22
2.1.7. POLIMORFISMOS NO GENE DA GRELINA E OBESIDADE.....	23
2.2. BUTIRILCOLINESTERASE .....	24
2.2.1. ORIGEM DO GENE <i>BCHE</i> .....	25
2.2.2. FORMAS MOLECULARES DA BChE.....	26
2.2.3. VARIABILIDADE GENÉTICA.....	28
2.2.3.1. GENE <i>BCHE</i> .....	28
2.2.4. FUNÇÃO BIOLÓGICA DA BChE .....	31
2.2.4.1. RELAÇÃO DA BChE COM PESO, ALTURA E ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC).....	32
3. OBJETIVO GERAL .....	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36

4.1. MATERIAL .....	36
4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS.....	36
4.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA .....	36
4.2.2. PCR.....	37
4.2.3. ELETROFORESE .....	38
4.3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS .....	42
5. RESULTADOS .....	44
5.1 VARIABILIDADE DO GENE GHRL .....	44
5.2. ÍNDICE DE MASSA CORPORAL, IDADE E ATIVIDADE. ....	47
6. DISCUSSÃO .....	54
6.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DE R51Q E L72M .....	54
6.2. VARIAÇÃO R51Q DO GENE GHRL E IMC .....	56
6.3. VARIAÇÃO L72M DO GENE GHRL E IMC.....	57
6.4. VARIAÇÃO L72M DO GENE GHRL E IDADE DE INÍCIO DA OBESIDADE.....	58
6.5. VARIAÇÃO L72M DO GENE GHRL E ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	59
7. CONCLUSÕES .....	62
REFERÊNCIAS .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Médias ( $\pm$ D.P.) de idade e de índice de massa corporal (IMC) em controles e obesos	35
<b>Tabela 2:</b> Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA na técnica de SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples).	37
<b>Tabela 3:</b> Condições das eletroforeses de SSCA para os diferentes fragmentos dos genes <i>GHRL</i> e <i>BCHE</i>	38
<b>Tabela 4:</b> Frequências genotípicas quanto ao sítio do gene <i>GHRL</i> codificador do aminoácido 51	43
<b>Tabela 5:</b> Frequências genotípicas quanto ao sítio do gene <i>GHRL</i> codificador do aminoácido 72	43
<b>Tabela 6:</b> Frequências alélicas (%) do gene <i>GHRL</i>	44
<b>Tabela 7:</b> Frequências genotípicas para o gene <i>GHRL</i> (N = 295, aa51; N = 296, aa72), referente à amostra total de descendentes de europeus de Curitiba	44
<b>Tabela 8:</b> Frequências alélicas de variantes de dois sítios do gene <i>GHRL</i> em amostra total de descendentes de europeus de Curitiba	45
<b>Tabela 9:</b> Distribuição de frequência dos genótipos de controles quanto aos genes <i>GHRL</i> da grelina e <i>BCHE</i> da butirilcolinesterase	45
<b>Tabela 10:</b> Distribuição de frequência dos genótipos de obesos quanto aos genes <i>GHRL</i> da grelina e <i>BCHE</i> da butirilcolinesterase	46
<b>Tabela 11:</b> Dados de idade, índice de massa corporal (IMC) e atividade da butirilcolinesterase de controles, classificados quanto ao aminoácido 72	47

codificado pelo gene *GHRL* da grelina

**Tabela 12:** Dados de idade, índice de massa corporal (IMC) e atividade da 47  
butirilcolinesterase de obesos, classificados quanto ao aminoácido 72 codificado  
pelo gene *GHRL*

**Tabela 13:** Médias de índice de massa corporal  $\pm$  erros padrões, em obesos 48  
classificados pelos genótipos dos genes da butirilcolinesterase e da grelina

**Tabela 14:** Média ( $\pm$  D.P.) da atividade (KU/L) da butirilcolinesterase em 48  
controles e obesos

**Tabela 15:** Distribuição de freqüência da atividade da butirilcolinesterase em 49  
126 obesos homozigotos para o alelo *72L*

**Tabela 16:** Distribuição de freqüência da atividade da butirilcolinesterase em 17 50  
obesos com a variante *72M* em hetero ou homozigose..

**Tabela 17:** Dados dos cinco obesos que possuem o alelo *72M* do gene *GHRL* e 51  
que apresentam os maiores níveis de atividade da butirilcolinesterase

**Tabela 18:** Coeficientes de correlação das variáveis idade, IMC, atividade da 51  
butirilcolinesterase, exon 1 e exon 4 do gene *BCHE* em relação à variável  
aminoácido 72, codificada pelo gene *GHRL*, em 144 controles

**Tabela 19:** Coeficientes de correlação das variáveis idade, IMC, atividade da 52  
butirilcolinesterase, exon 1 e exon 4 do gene *BCHE* em relação à variável  
aminoácido 72, codificada pelo gene *GHRL*, em 130 obesos

**Tabela 20:** Resultados da análise de regressão múltipla escalonada, referentes 53  
à amostra de obesos (N = 130), considerando-se a atividade da  
butirilcolinesterase como variável dependente (Y)

<b>Tabela 21:</b> Comparações entre as frequências genotípicas de dois sítios do gene <i>GHRL</i> entre o presente estudo e o realizado por Ukkola <i>et. al.</i> (2001)	55
<b>Tabela 22:</b> Comparações entre as frequências alélicas de dois sítios do gene <i>GHRL</i> entre o presente estudo e o realizado por Ukkola <i>et. al.</i> (2001)	56



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho esquemático do gene *GHRL*, mostrando os cinco exons 4  
(retângulos) e os introns (linhas) que o compõem.
- Figura 2:** Peptídeo (grelina) maduro com 28 aminoácidos, mostrando a serina 3 5  
n-octanoilada
- Figura 3:** Sítios de ação, produção e função da grelina e obestatina, os sinais + 15  
indicam uma ação positiva do peptídeo, os sinais de – indicam uma ação  
negativa do peptídeo.
- Figura 4:** Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons 24  
(em negrito) os introns e o tamanho do gene
- Figura 5:** Gel de poliacrilamida 29:1, 10% descontínuo. 1 – 51RR, 2 – 51RQ 38
- Figura 6:** Gel de poliacrilamida 29:1, 8% contínuo. 1 – 72LM, 2 – 72MM, 3 – 39  
72LL
- Figura 7:** Frequências de homozigotos para o alelo 72L, distribuídas segundo o 49  
nível de atividade da butirilcolinesterase
- Figura 8:** Frequências de homozigotos e heterozigotos para o alelo 72M, 50  
distribuídas segundo o nível de atividade da butirilcolinesterase

## LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E SIGLAS

R	Arginina
AChE	Acetilcolinesterase
ACTH	Hormônio Adenocorticotrófico
AGRP	Proteína Relacionada a Agouti
AMPK	Proteinase Ativada por Adenosina Monofosfato
ARC	Núcleo Arqueado
BChE	Butirilcolinesterase (colinesterase do soro)
<i>BCHE</i>	Gene da Butirilcolinesterase
D.P.	Desvio Padrão
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E.P.	Erro Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
GH	Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
<i>GHL</i>	Gene da Grelina
GHS	Secretagogo do Hormônio do Crescimento
GHS-R	Receptor do Secretagogo do Hormônio do Crescimento
GPCR	Receptor de ligação para proteína G
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
IMC	Índice de massa corporal
L	Leucina

M	Metionina
NaF	Fluoreto de Sódio
NPY	Neuropeptídeo Y
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	Fenil-Mil-sulfonil-fluoreto
Q	Glutamina
RCQ	Razão Cintura Quadril
SSCA	<i>Single Strand Conformational Analysis</i> , Análise de Conformação de Fita Simples.
VMN	Núcleo Ventromedial

## RESUMO

O presente estudo determinou, através da técnica de PCR-SSCA, as variações *R51Q* e *L72M* do gene *GHRL* em homens euro-brasileiros, sendo 144 obesos ( $IMC \geq 30$ ) e 153 controles ( $20 \leq IMC < 25$ ), doadores de sangue de Curitiba, e analisou-as no que se refere ao índice de massa corporal (IMC), idade e atividade da butirilcolinesterase (BChE), isoladas ou em conjunto com as variantes dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*. As frequências genotípicas e alélicas não diferiram em obesos e controles em relação às variantes *R51Q* ( $\chi^2 = 0,004$ ;  $p > 0,90$  e  $\chi^2 = 0,26$ ;  $p > 0,60$ , respectivamente) e *L72M* ( $\chi^2 = 0,026$ ;  $p > 0,95$  e  $\chi^2 = 0,01$ ;  $p > 0,90$ , respectivamente). Quando estes dados foram comparados com os de Ukkola et. al. (2001), foi encontrada diferença significativa decorrente de menor frequência de *51Q* no presente estudo. Devido ao pequeno número de indivíduos com o alelo *51Q* ( $N = 3$ ), não foi possível realizar análise estatística relacionando esse sítio do DNA com as demais variáveis estudadas. Quando se analisou a variante *L72M* em relação ao IMC não foi encontrada diferença significativa entre as médias obtidas de indivíduos *72LL* e *72LM+72MM* ( $t = 1,22$ ;  $p > 0,20$  em controles;  $t = 0,06$ ;  $p > 0,95$ , em obesos). Também não foi encontrada diferença entre as médias de IMC quando se compararam os genótipos *72LL* e *72LM+72MM* em obesos, classificados quanto às variantes dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*. Em relação à atividade da BChE, foi encontrada correlação positiva entre o alelo *72M* e maior atividade dessa enzima ( $r = 0,185$ ;  $p < 0,05$ ) em obesos. Uma análise de regressão múltipla escalonada mostrou associação positiva do alelo *72M* com atividade da BChE. Os resultados do presente

trabalho não corroboraram a hipótese inicial de que as variações *R51Q* e *L72M* pudessem estar associadas com o IMC, entretanto a associação positiva encontrada entre o alelo *72M* e maior atividade da BChE se mostra interessante, demandando mais estudos a respeito.

## ABSTRACT

This study determined the variations *R51Q* and *L72M* of the *GHRL* gene by PCR-SSCA in Euro-Brazilian men, being 144 obese individuals (BMI  $\geq 30$ ) and 153 controls ( $20 \leq \text{BMI} < 25$ ) and analyzed them in relation to body mass index (BMI), age and activity of butyrylcholinesterase (BChE) alone or in connexion to the variants of exons 1 and 4 of the *BCHE* gene. The genotype and allele frequencies did not differ in obese and control samples for the variants *R51Q* ( $\chi^2 = 0.004$ ,  $p > 0.90$  and  $\chi^2 = 0.26$ ,  $p > 0.60$ , respectively) and *L72M* ( $\chi^2 = 0.026$ ,  $p > 0.95$  and  $\chi^2 = 0.01$ ,  $p > 0.90$ , respectively). When these data were compared with those found by Ukkola et. al. (2001) significant difference was found in view of lower frequency of the *51Q* in the present study. Due to the low number of individuals with the *51Q* allele ( $N = 3$ ) it was not possible to perform any statistical analysis of this DNA site with the other studied variables. When the variable *L72M* was analyzed in relation to the mean of BMI, no mean significant difference was found between *72LL* and *72LM + 72 MM* individuals ( $t = 1.22$ ;  $p > 0.20$  in controls;  $t = 0.06$ ;  $p > 0.95$ , in obese people). No difference was found in mean BMI when the genotypes *72LL* and *72LM + 72 MM* were compared in obese individuals, as classified by the variants of exons 1 and 4 of the *BCHE* gene. Regarding BChE activity, positive correlation was found between the allele *72M* and a higher enzyme activity ( $r = 0.185$ ,  $p < 0.05$ ) in obese individuals. A multiple step-wise regression analysis showed positive correlation between *72M* with BChE activity. The results from the present study did not support the initial hypothesis that the variations *R51Q* and *L72M* may be associated with BMI. However, the positive association

found between the allele *72M* and BChE activity is very interesting, demanding more studies on the subject.

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um fator de risco para várias doenças graves, como cardiovasculares, diabetes, sendo determinada por diversos fatores genéticos e ambientais. Ela é considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma epidemia mundial, sendo a principal causa de mortes nos Estados Unidos e Canadá.

A descoberta da grelina abriu uma gama de possibilidades de estudos nas áreas de Endocrinologia e Metabolismo.

Bowers *et al.* (1980) mostraram que um tipo de GHS (*Growth Hormone Secretagogue*; secretagogo do hormônio do crescimento) participava da via reguladora da liberação do GH (*Growth Hormone*; hormônio do crescimento) juntamente com o já conhecido GHRH (*Growth Hormone Release Hormone*; hormônio de liberação do hormônio do crescimento). Desde então, vários GHSs sintéticos foram desenvolvidos e a estrutura do GHS-R (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*; receptor do secretagogo do hormônio do crescimento) foi desvendada (Smith *et. al.*, 1996). O ligante endógeno do GHS-R era desconhecido até a descoberta da grelina. Este achado inaugurou um novo campo de estudo relacionado ao GH e à regulação do apetite. Foram relatadas evidências de que o controle para a liberação do GH não é só exercido pelo GHRH, mas também pela grelina, e, além disso, a grelina também funciona como um sinal para a necessidade da ingestão, agindo de forma antagonista à leptina, um peptídeo com funções determinantes de saciedade. Em vista dos dados encontrados, a grelina talvez seja um hormônio essencial para a manutenção do GH e para a homeostase energética.



A grelina foi identificada em 1999 (Kojima *et al.*, 1999) e é o primeiro exemplo de um peptídeo modificado por um ácido graxo, modificação que é essencial para sua atividade. O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26).

A butirilcolinesterase (*BCHE*; EC 3.1.1.8) é uma enzima sérica produzida no fígado e codificada pelo gene *BCHE* (Arpagaus *et al.*, 1990), localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2). Atualmente, mais de 65 variantes foram identificadas no gene *BCHE*, por métodos de identificação ao nível do DNA.

A interação do gene *BCHE* e do gene *CHE2*, que determina proteína ainda não identificada, condiciona o complexo C<sub>5</sub>, determinante do fenótipo CHE2 C5+, associado com peso e IMC mais baixos do que o fenótipo CHE2 C5- (Chautard-Freire-Maia *et al.*, 1991; Alcântara *et al.*, 2001).

Segundo Souza *et al.* (2005a), a própria BChE pode estar relacionada com o Metabolismo de lípidos, uma vez que variantes do aminoácido 539 dessa enzima afetam diferentemente a distribuição do IMC. Andrade *et al.* (2008), continuando o estudo de Souza *et al.* (2005a) e genotipando as mesmas amostras, quanto ao sítio -116 do exon 1 do gene *BCHE*, verificaram que o alelo -116A está associado com o aumento da variância da distribuição do IMC e deve ser o responsável pelo resultado obtido por Souza *et al.* (2005a), uma vez que a variante 539T, do exon 4 do gene *BCHE*, só afeta o IMC, quando na presença de -116A.

O presente estudo visou principalmente pesquisar as relações entre as variações do gene *GHRL* e a obesidade, levando também em consideração as variações dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio multifuncional, secretado pelo órgão somatotrófico da região anterior da pituitária. Regula todo o crescimento celular e corporal, Metabolismo de carboidratos, proteínas e lípidos, bem como mantém o balanço eletrolítico (Aetsinger *et al.*, 1996).

O GH é controlado por muitos fatores, em particular por dois neuropeptídeos hipotalâmicos (GHRH e somatostatina, esse último age inibindo o GH). Recentemente, uma terceira via de controle do GH foi descoberta em estudos com secretagogos do GH (GHSs) (Dickson *et al.*, 1999). GHSs são componentes sintéticos, que são potentes estimuladores para a liberação do GH, atuando mediante um receptor proteico específico (GHS-R) (Korbonits *et al.*, 1999). Por serem componentes sintéticos, foi postulado que deveria existir um ligante natural para o receptor do secretagogo do GH, que tivesse uma estrutura similar aos GHSs no sítio de ligação ao receptor (Smith *et al.*, 1996).

Vários grupos tentaram, sem sucesso, isolar o ligante endógeno para o GHS-R, usando extratos do cérebro, pituitária e hipotálamo, regiões nas quais há expressão do GHS-R (Bennet *et al.*, 1997 e Guan *et al.*, 1997). Inesperadamente conseguiu-se, em 1999, isolar e identificar o ligante natural do GHS-R em tecidos de estômago e nomearam-no de grelina (GHRL) (Kojima *et al.*, 1999 e 2001). A grelina é um peptídeo estimulador de apetite e que atua na liberação do GH (Korbonits *et al.*, 2004). O nome grelina é baseado em “*ghre*” uma palavra de origem proto-indo-

européia que significa crescimento, em alusão ao fato de estimular o GH (Kojima e Kangawa, 2005).

## **2.1. GENE DA GRELINA – LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA**

O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) e o gene do receptor para a grelina (*GHS-R*) também foi localizado nesse cromossomo (3q26-q27) (Smith *et al.*, 1997).

O gene da grelina humana, assim como o do camundongo, contém cinco exons (Figura 1) (Tanaka *et al.*, 2001; Kojima e Kangawa 2005). O primeiro e mais curto contém apenas 20 pb, e engloba parte da região 5' não traduzida (5' UTR), não sendo considerado por outros autores que consideram o gene da grelina como tendo 4 exons (Ukkola *et.al.*, 2001).

Figura 1: Desenho esquemático do gene *GHRL*, mostrando os cinco exons (retângulos) e os introns (linhas) que o compõem.

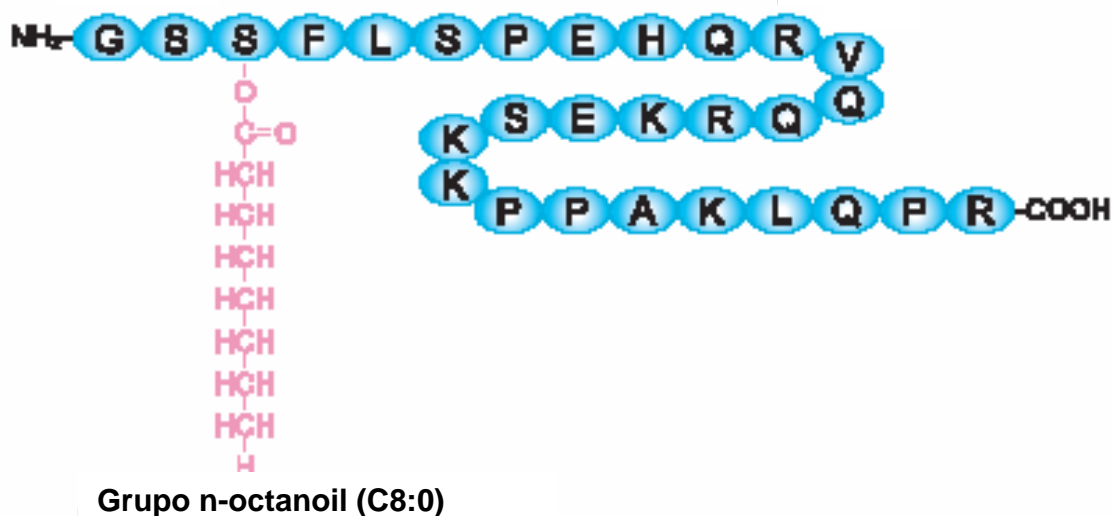


FONTE: Kojima e Kangawa, 2005

A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos (Figura 2), codificado pelos exons 2 e 3 (Kojima e Kangawa, 2005). No rato e no camundongo o códon para o aminoácido Q14 (CAG) é usado como sinal para processamento alternativo, gerando

assim dois mRNAs diferentes (Hosoda *et al.*, 2000b). Um codifica o precursor da grelina e o outro o precursor da grelina des-Q14.

Figura 2: Peptídeo da grelina humana madura com 28 aminoácidos, mostrando a serina 3 n-octanoilada.



FONTE: KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Phisio. Rev.**, v. 85, p. 495-522, 2005.

A sequência de aminoácidos em mamíferos para o precursor da grelina é bastante conservada. Nesses precursores a sequência ativa da grelina com 28 aminoácidos vem logo após o peptídeo sinal. O sítio de clivagem para o peptídeo sinal é o mesmo em todas as grelinas de mamíferos (Kojima e Kangawa, 2005).

O precursor da grelina humana, codificado pelos 5 exons do gene *GHRL* (sendo o exon 1 codificador da região 5' UTR), é constituído por 518 pb codificados em uma sequência de 117 aminoácidos, distribuídos em 23 aminoácidos do peptídeo

sinal e 94 aminoácidos da pró-grelina, os quais compreendem os 28 aminoácidos da grelina madura e mais 66 aminoácidos, que incluem os 23 da obestatina, hormônio com características antagônicas à grelina, que suprime o apetite e a atividade estomacal. (Kojima *et. al.*, 1999; Zhang *et. al.*, 2005)

### **2.1.2. ESTRUTURA DA GRELINA**

A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos, no qual a terceira serina (ser3) está *n-octanoilada*, que é uma condição essencial para a atividade da grelina. A grelina é o primeiro caso de um peptídeo modificado por um ácido graxo (Kojima *et al.*, 1999).

No curso dos estudos sobre a grelina, várias outras formas naturais do peptídeo foram identificadas (Hosoda *et al.*, 2003). Estas formas podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com o tipo de acilação observada na serina 3: não acilada (sem modificação pós-traducional), e as formas modificadas pós tradução, como, octanoilada (C8:0), decanoilada (C10:0), e possivelmente decenoilada (C10:1). Todos esses peptídeos encontrados têm 27 ou 28 aminoácidos e são derivados do mesmo precursor da proteína por duas vias diferentes de recomposição, sendo que a principal forma da grelina é a de 28 aminoácidos com a serina 3 octanoilada (Kojima e Kangawa, 2005).

#### **2.1.2.1. FORMA DES-ACILADA DA GRELINA**

A forma des-acilada da grelina também existe em níveis significativos no estômago e no sangue (Hosoda *et al.*, 2000a). No plasma essa forma da grelina é encontrada predominantemente (80% a 90%) e se liga às lipoproteínas de alta densidade (HDLs), que contêm algumas esterases (Beaumont *et al.*, 2003). Portanto, a forma des-acilada da grelina seria um produto de modificação da forma acilada. A forma des-acilada da grelina não substitui a grelina acilada nas regiões de ligação no hipotálamo e pituitária e também não mostra atividade endócrina nem em ratos nem em humanos (Kojima e Kangawa, 2005). A questão que surge então é onde atuaria essa forma des-acilada da grelina. Baldanzi *et al.* (2002) sugeriram a existência de um outro receptor para a grelina no sistema cardiovascular, pois mostraram que tanto a grelina acilada quanto a des-acilada reconhecem uma região de ligação em cardiomiócitos que não possui o receptor para a grelina (GHS-R). Além disso, foi destacado que a forma des-acilada compartilha, com a forma acilada, algumas ações não endócrinas como o controle de proliferação celular e adipogênese (Cassoni *et al.*, 2004).

#### **2.1.2.2. DESACILAÇÃO DA GRELINA PELA BUTIRILCOLINESTERASE E OUTRAS ESTERASES**

No soro, a grelina está, em sua maioria, desoctanoilada. Este processo de desoctanoilização é fortemente diminuído por fluoreto fenilMilsufonil, um inibidor de proteases serínicas e esterases.

No soro humano, a desoctanoilização da grelina é parcialmente inibida por salicinato de eserina e por fluoreto de sódio, dois inibidores da butirilcolinesterase. A

butirilcolinesterase purificada é capaz de degradar a grelina, e há uma relação positiva entre a butirilcolinesterase e a desoctanoilização da grelina no soro humano. Comparado com o soro humano, o soro de ratos tem bem menos butirilcolinesterase, mas uma maior atividade de hidrólise em relação à grelina, indicando que há uma outra esterase para essa reação no soro de ratos.

A desoctanoilização da grelina é fortemente inibida por PMSF, um inibidor de proteases serínicas e esterases, mas não por 4-(amidino-fenil)-Manosufonil fluoreto, um inibidor irreversível e específico para proteases serínicas.

As esterases do soro têm uma especificidade ampla com o substrato com algumas diferenças individuais e interespecíficas. Elas são classificadas em três grupos: A, B e C, de acordo com o tipo de interação com organofosfatos.

As esterases do tipo A (arilesterases/paraoxonases) do soro humano catalisam a hidrólise de ésteres aromáticos, como o paraoxon e fenilacetato. O cálcio é necessário para que ocorra o processo de catálise e esta atividade é reduzida quando é adicionado EDTA. Por conta de a grelina estar associada ao HDL, que contém paraoxonase, supôs-se que essa enzima pudesse estar relacionada com a desoctanoilização da grelina. Porém, De Vriese *et al.* (2004) mostraram que a desoctanoilização da grelina não é inibida por EDTA. Além do mais, a inibição da desoctanoilização da grelina por PMSF indica que as esterases B, ao invés da A e C, são as que contribuem para a reação de desoctanoilização.

As esterases do tipo B hidrolisam ésteres alifáticos e são inibidas por organofosfatos. As esterases do tipo C (colinesterases) são inibidas pelos

organofosfatos e hidrolisam preferencialmente ésteres de colina a uma taxa maior do que ésteres aromáticos e alifáticos.

A acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase são ambas inibidas por eserina e NaF. Sendo que a butirilcolinesterase humana purificada desoctanoiliza a grelina. Entretanto, a eserina e o NaF inibem apenas parcialmente a desoctanoilização da grelina. Uma relação positiva entre a butirilcolinesterase e a desoctanoilização da grelina foi encontrada. Por conta de que a butirilcolinesterase representa uma proporção significativa das atividades de esterases no soro humano, seu papel no processo de desoctanoilização da grelina é provável, mas ela não parece ser a única enzima que participa desse processo.

Esterases do tipo B também incluem carboxilesterases não específicas encontradas no soro e nos tecidos. Estas enzimas catalisam a hidrólise de uma variedade de drogas e substâncias que contêm ligações amida ou éster, bem como componentes endógenos como acil-gliceróis de cadeia curta e longa e ésteres de cadeia longa de coenzima-A, indicando que essas esterases possam participar no Metabolismo de drogas e de lípides endógenos.

Carboxilesterases purificadas do fígado são capazes de degradar a grelina para sua forma des-acilada, sugerindo que as carboxilesterases podem participar no processo de desoctanoilização. Em ratos, a desoctanoilização da grelina é mais rápida do que em humanos, sendo isso consistente com a atividade da carboxilesterase encontrada no soro dos ratos.

No soro de ratos a desoctanoilização da grelina é inibida por BNPP, um inibidor de carboxilesterases. Em contraste, no soro de humanos, De Vriese *et al.*



(2004) não encontraram sinais de inibição da desoctanoilização da grelina por BNPP. Isto indica que a carboxilesterase não está relacionada ao processo de desoctanoilização da grelina no soro humano, estando de acordo com Li *et al.* (2000), que concluíram não existir carboxilesterases no soro humano.

#### **2.1.2.3. ENZIMA ACIL-MODIFICADORA PARA A GRELINA**

Uma enzima que cataliza a acilação da grelina ainda não foi identificada. A incorporação do ácido n-octanóico em anfíbios, peixes, mamíferos e aves sugere que esta enzima seja específica na transferência de uma cadeia de tamanho médio de ácido graxo (Kojima e Kangawa, 2005).

Foram encontradas evidências de que a ingestão de cadeias de ácidos graxos de tamanho médio, bem como de trigliceróis de tamanho médio aumentam a produção da grelina acil-modificada sem modificar o nível total (acilada e des-acilada) da grelina. O grupamento acil que se liga à grelina recém sintetizada corresponde aos que foram ingeridos, indicando que os ácidos graxos ingeridos são usados diretamente para a acilação da grelina (Kojima *et al.*, 2005; apud Kojima e Kangawa, 2005).

Um número de acil-transferases foi identificado em mamíferos. Na mucosa do estômago de ratos foi encontrada uma acil-transferase que catalisa a transferência de acil – CoA para as proteínas do muco (Kasinathan *et al.*, 1990). A enzima ser O-acil-transferase que modifica a grelina ainda não é conhecida mas deve ter alguma homologia estrutural com essas acil-transferases.

#### **2.1.2.4. DERIVADOS DA GRELINA**

Produção de derivados da grelina por via sintética mostra que os grupos hidrofóbicos ligados ao terceiro aminoácido são essenciais para uma atividade máxima da grelina (Bednarek *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001). A atividade máxima da grelina foi observada quando a grelina estava n-octanoilada.

Um peptídeo pequeno, contendo apenas os primeiros quatro aminoácidos da grelina, ainda consegue ativar o GHS-R. Entretanto, apenas os três primeiros são incapazes de ativar o receptor, o que indica que os quatro primeiros peptídeos constituem o mínimo essencial para essa ação (Bednarek *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001).

#### **2.1.3. CONCENTRAÇÃO DA GRELINA E DISTRIBUIÇÃO DA GRELINA**

##### **2.1.3.1. CONCENTRAÇÃO**

A concentração normal da grelina no plasma sanguíneo em humanos é de 10 – 20 fmol/ml para a grelina n-octanoilada e 100 – 150 fmol/ml para a grelina total (acilada e des-acilada). A concentração da grelina no plasma aumenta em condições de jejum e reduz após alimentação, sugerindo assim que a grelina possa ser um sinal inicial para o aumento do apetite (Cummings *et al.*, 2001). A concentração de grelina no plasma é mais baixa em obesos do que em controles com IMC normal, pareados por idade, o que sugere um processo de regulação (Hansen *et al.*, 2002).

### **2.1.3.2. DISTRIBUIÇÃO NO ORGANISMO**

#### **2.1.3.2.1. ESTÔMAGO E ÓRGÃOS GASTROINTESTINAIS**

A grelina é produzida principalmente no estômago, em vertebrados. As células produtoras de grelina do estômago são mais abundantes no fundus (corpo) do que no piloro (Date *et al.*, 2000a). Estudos por hibridização *in situ* e por análises histoquímicas indicam que as células produtoras de grelina (X/A) são um tipo distinto de célula endócrina encontrada na mucosa do estômago (Date *et al.*, 2000).

Células imunorreativas para a grelina também são encontradas no duodeno, jejuno, íleo, e cólon (Date *et al.*, 2000a). O pâncreas também é um órgão produtor de grelina, porém há controvérsias quanto às células que a produzem nesse órgão (Date *et al.*, 2002).

#### **2.1.3.2.2 CÉREBRO E PITUITÁRIA**

A grelina já foi encontrada no núcleo arqueado do hipotálamo, uma importante região controladora do apetite (Lu *et al.*, 2002) e estudos recentes também indicaram a presença da grelina em neurônios hipotalâmicos de tipo não caracterizado previamente (Cowley *et al.*, 2003).

A grelina foi encontrada nas glândulas pituitárias onde pode agir na liberação do GH por uma via autócrina ou parácrina (Kojima e Kangawa, 2005).

#### **2.1.3.2.3. OUTROS TECIDOS**

O mRNA referente à grelina é expresso no rim, especialmente no glomérulo (Gnanapavan *et al.*, 2002), sendo que, estratos de peptídeos de rim de ratos contêm tanto as formas acilada quanto des-acilada da grelina em quantidades significativas.

Células imunorreativas para a grelina foram encontradas em citotrofoblastos da placenta no primeiro trimestre da gravidez e não foram detectadas no segundo trimestre (Gualillo *et al.*, 2001). A grelina foi encontrada em células do sinciciotrofoblasto da placenta humana e em células trofoblásticas labirínticas da placenta do rato.

#### **2.1.4. RECEPTOR DA GRELINA**

O receptor da grelina é um GPCR típico (receptor de ligação para uma proteína G) com sete domínios trans-membrânicos (7-TM) (Smith *et al.*, 1999). Dois cDNAs distintos de receptores da grelina foram identificados (Howard *et al.*, 1996). O primeiro, GHS-R tipo 1a, codifica um GPCR 7-TM com propriedades de ligação e funcionais consistentes com seu papel como receptor da grelina. O tipo 1b é produzido por um mecanismo de recomposição alternativa (Howard *et al.*, 1996). O gene para o GHS-R consiste de dois exons; o primeiro codifica os domínios trans-membrânicos do 1 ao 5, e o segundo codifica os domínios 6 e 7. O tipo 1b é derivado apenas do primeiro exon, que codifica apenas cinco dos sete domínios

transmembrânicos, correspondendo a uma forma COOH-truncada do tipo 1a, sendo inativo farmacologicamente.

O receptor da grelina é bem conservado entre todas as espécies de vertebrados estudadas, incluindo vários mamíferos, galinhas e baiacus (fugu) (Palyha *et al.*, 2000). Esta forte conservação sugere que a grelina e seu receptor têm uma função fisiológica muito importante.

#### **2.1.4.1. ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PARA A GRELINA**

A ativação do receptor para a grelina se dá pela ligação dela ao GHS-R ativando a fosfolipase C para gerar IP<sub>3</sub> e diacilglicerol, resultando num aumento do nível interno de Ca<sup>2+</sup>, indicando que o receptor para a grelina está associado a uma subunidade G<sub>q</sub>, isto é, uma subunidade da família de proteínas que se ligam ao nucleotídeo guanina (Kojima e Kangawa, 2005).

#### **2.1.4.2. DISTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR PARA A GRELINA**

O mRNA do receptor para a grelina é proeminentemente expresso no núcleo arqueado (ARC) e ventromedial (VMN) e no hipocampo (Nakazato *et al.*, 2001). O mRNA do GHS-R também é detectado em múltiplos núcleos hipotalâmicos e na pituitária, bem como em outras regiões (Kojima e Kangawa, 2005).

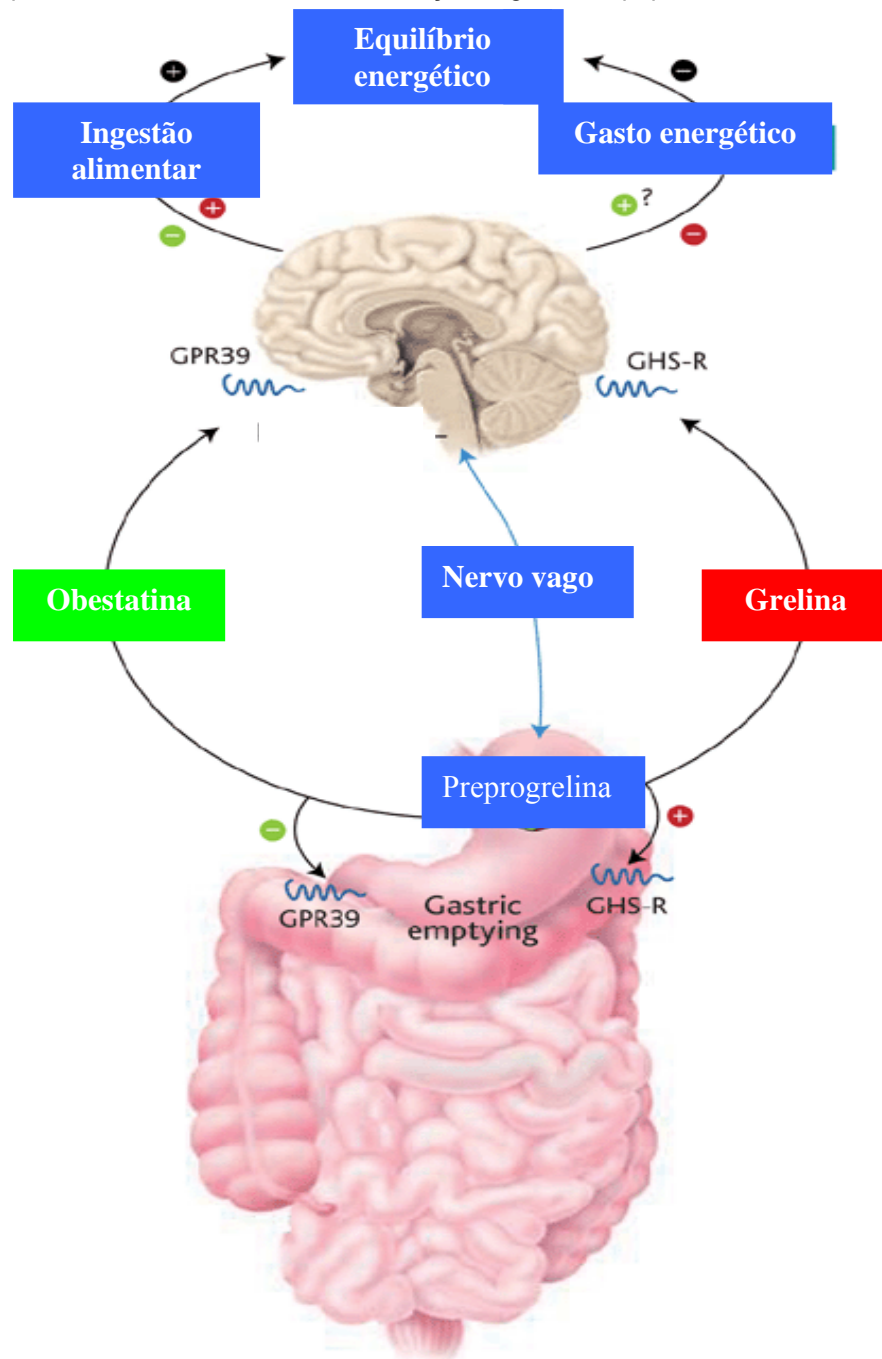
Análises por RT-PCR demonstraram que o mRNA do GHS-R é expresso em vários órgãos, incluindo o coração, rim, pulmão, fígado, pâncreas, estômago,

intestinos fino e delgado, tecido adiposo e células do sistema imune (Gnanapavan *et al.*, 2002).

#### **2.1.5. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA GRELINA**

A figura 3 mostra um esquema de ação da grelina e da obestatina no corpo humano. A grelina, que se liga ao GHS-R, causa um aumento na ingestão alimentar e uma diminuição no gasto energético. A obestatina, que se liga ao receptor GPR39 faz o inverso, ela aumenta o gasto energético e diminui a ingestão alimentar. Esses dois hormônios trabalham no sentido de manter um equilíbrio energético.

Figura 3: Sítios de ação, produção e função da grelina e obestatina, os sinais + indicam uma ação positiva do peptídeo, os sinais de – indicam uma ação negativa do peptídeo.



Fonte: Nogueiras et. al., 2005.

#### 2.1.5.1. ATIVIDADE DE LIBERAÇÃO DO GH

A grelina é um hormônio com várias propriedades. Age no GHS-R aumentando a concentração interna de  $\text{Ca}^{2+}$  via  $\text{IP}_3$  para estimular a liberação de GH. Comparado ao efeito estimulador do GHRH (um outro hormônio relacionado à liberação do GH), que age no seu próprio receptor, o efeito causado pela grelina na liberação de GH é duas a três vezes maior (Arvat *et al.*, 2000).

A grelina estimula a liberação de GH tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, diretamente proporcional à dose aplicada (Arvat *et al.*, 2000). A liberação de GH atinge o seu pico em aproximadamente 5 a 15 minutos após a injeção intravenosa de grelina e cai ao nível basal, uma hora após a injeção. Uma simples administração de grelina intracerebroventricularmente também aumenta a concentração de GH no plasma de ratos de uma maneira diretamente proporcional, com uma dose mínima de 10 pmol (Date *et al.*, 2000b).

A grelina estimula a liberação de GH a partir da pituitária primária (Kojima *et al.*, 1999). Entretanto, o próprio hipotálamo parece estar envolvido na estimulação da liberação do GH mediada pela grelina. Pacientes com lesões no hipotálamo mostraram uma liberação insuficiente do GH mesmo quando estimulados pela grelina (Popovic *et al.*, 2003).

Altas doses de grelina em humanos aumentam os níveis de ACTH, prolactina e cortisol (Arvat *et al.*, 2001).



### 2.1.5.2. REGULAÇÃO DO APETITE

A grelina funciona de modo a transmitir sinais de fome para o cérebro. Análises imunohistoquímicas indicaram que os neurônios que contêm grelina são encontrados no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, uma região envolvida na regulação do apetite (Lu *et al.*, 2002). No ARC, estes neurônios que contêm grelina possuem fibras eferentes para neurônios que expressam os peptídeos NPY e AGRP, estimulando a liberação destes peptídeos orexigênicos, e neurônios produtores de proopiomelanocortin (POMC) que suprimem a liberação de peptídeos anorexigênicos (Cowley *et al.*, 2003) .

Quando a grelina é injetada nos ventrículos cerebrais de ratos, a ingestão alimentar é estimulada (Kamegai *et al.*, 2001). Injeção intracerebroventricular de grelina de forma crônica aumenta de modo cumulativo a ingestão alimentar e diminui o gasto de energia, levando a um aumento de peso.

Quando a grelina é injetada periféricamente ela consegue estimular os neurônios hipotalâmicos (Ruter *et al.*, 2003). Porém, a taxa com que a grelina atravessa a barreira sangue-cérebro é bastante baixa. Isto sugere que a grelina deve ativar as regiões hipotalâmicas adequadas por uma outra via.

A detecção de receptores para a grelina nos neurônios vagais aferentes nos gânglios nodosos dos ratos sugere que os sinais da grelina enviados do estômago são transmitidos para o cérebro através do nervo vago (Sakata *et al.*, 2003). Além disso, a observação de que a administração intracerebroventricular de grelina induz um aumento de c-Fos no núcleo dorsomotor do nervo vago e estimula a secreção de

ácido gástrico, indica que a grelina ativa o sistema vago (Date *et al.*, 2001). Em contraste, uma vagotomia inibe a habilidade da grelina de estimular a ingestão alimentar e a liberação de GH (Date *et al.*, 2002).

A grelina é produzida primariamente nos órgãos gastrointestinais em resposta a fome, e circula pelo sangue servindo como um sinal periférico que avisa ao sistema nervoso central para estimular a ingestão alimentar. Os níveis de grelina no plasma aumentam imediatamente antes de cada refeição e caem aos níveis mínimos 1 hora após a ingestão (Cummings *et al.*, 2001).

O aumento inicial dos níveis de grelina foi observado em humanos que iniciaram as refeições em qualquer horário e sem disposição para comer (Cummings *et al.*, 2004). De fato os níveis de grelina e de fome se mostraram positivamente relacionados. Além disso, a diminuição tardia do nível de grelina no plasma é proporcional à quantidade de calorias ingeridas (Callahan *et al.*, 2004).

A expressão do gene da grelina no estômago aumenta com o jejum e diminui com a administração de leptina e interleucina (IL)-1 $\beta$  (Kim *et al.*, 2003). A grelina produz um balanço energético positivo devido a promoção da ingestão alimentar e à diminuição do gasto de energia, bem como pelo bloqueio da anorexia induzida pela IL-1 $\beta$ .

#### **2.1.5.3. A GRELINA E A OREXINA**

A orexina, um neuropeptídeo hipotalâmico orexigênico, está envolvido na estimulação e regulação da ingestão alimentar (Chemelli *et al.*, 1999). Sua injeção

intracerebroventricular estimula a ingestão alimentar, e sua expressão está negativamente correlacionada com os níveis de glicose e leptina no sangue, bem como com os níveis de ingestão alimentar (Siegel, 2004). A grelina estimula, isoladamente, os neurônios para orexina, ao passo que a glicose e a leptina os inibem (Yamanaka *et al.*, 2003). Injeção intracerebroventricular de grelina induz a uma expressão Fos nas células produtoras de orexina (Toshinai *et al.*, 2003). A atividade estimuladora de apetite da grelina é reduzida em ratos onde não existem as orexinas. Injeções contendo grelina com antagonistas para NPY-Y1 e anti-orexina IgG mostraram uma supressão de 87% na ingestão alimentar. Estes resultados indicaram que os comportamentos alimentares são regulados cooperativamente entre a grelina e a orexina (Kojima e Kangawa, 2005).

#### **2.1.5.4. MECANISMOS DE ESTIMULAÇÃO DE APETITE PELA GRELINA**

O ARC hipotalâmico é a região principal de ação da grelina no sistema nervoso central. O ARC também é um alvo da leptina, um hormônio supressor de apetite produzido nas células adiposas, e dos peptídeos NPY e AGRP, os quais são estimuladores de apetite (Flier, 2004). NPY e AGRP são produzidos pela mesma população de neurônios no ARC, e seus efeitos estimuladores de apetite são inibidos diretamente pela leptina. De fato, uma parte dos efeitos orexigênicos da grelina funcionam por regulação dos genes que codificam esses estimulantes de apetite.

Injeção intracerebroventricular de grelina induz expressão Fos nos neurônios que expressam o NPY e assim aumenta a quantidade de mRNA de NPY no ARC

(Nakazato *et al.*, 2001) e também aumenta o nível de mRNA de AGRP no hipotálamo.

Recentemente, foi descoberto que a quinase ativada por AMP (AMPK) está envolvida nos processos hipotalâmicos de regulação do apetite (Minokoshi *et al.*, 2004). Quando a grelina é administrada *in vivo* a atividade da AMPK se mostra aumentada no hipotálamo. Em contraste, quando a leptina é injetada a atividade da AMPK se mostra diminuída.

#### **2.1.5.5. FUNÇÕES GASTROINTESTINAIS**

Administração intravenosa de grelina aumenta a secreção do ácido gástrico e estimula a movimentação gástrica (Dornonville *et al.*, 2004). Em termos de secreção de ácido gástrico, a resposta máxima obtida com a grelina é cerca de 3mg/kg. Do mesmo modo que ocorre com a injeção intravenosa, uma injeção intracerebroventricular aumenta a secreção de ácido gástrico de acordo com a dose aplicada (Date *et al.*, 2001).

#### **2.1.5.6. FUNÇÕES CARDIOVASCULARES**

Estudos feitos no coração e na aorta observaram expressão de mRNA que codifica tanto para a grelina quanto para seu receptor e, além disso, injeção intravenosa de grelina reduz a pressão arterial (Nagaya *et al.*, 2001).

Bolus (isto é, quantidade elevada) de grelina injetados intravenosamente diminuem a pressão arterial principal sem modificar a taxa de batimento cardíaco (Nagaya *et al.*, 2001). Ratos com problemas cardíacos, quando tratados com grelina, mostraram um aumento na potência dos batimentos cardíacos, volume maior e dP/dt ventricular esquerda máxima, quando comparados com ratos controles afligidos pelo mesmo problema mas tratados com placebo (Nagaya e Kangawa, 2003).

A diminuição na pressão arterial induzida pela grelina parece não ocorrer através de sua ação direta no sistema circulatório, mas através da sua ação no cérebro, especificamente no núcleo do trato solitário (Matsumura *et al.*, 2002). Injeção de grelina diretamente nesses núcleos diminui significativamente a pressão arterial e a taxa de batimento cardíaco. Este tipo de injeção também suprime a atividade simpática.

#### **2.1.6. REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE GRELINA**

O fator mais importante para a regulação da secreção da grelina é a alimentação. O nível de glicose no sangue também pode ser um fator crítico, quando a glicose é administrada oral ou intravenosamente a concentração de grelina no plasma diminui (Shiia *et al.*, 2002). A concentração de grelina no plasma é sensível, entretanto ao número e horário de refeições; e diminui mediante a uma refeição rica em gordura (Erdmann *et al.*, 2003 e Greenman *et al.*, 2004).

A concentração de grelina no plasma é mais baixa em indivíduos obesos do que em não obesos (Tschöp *et al.*, 2001 e Haqq *et al.*, 2003). Relacionado a este

fato, o nível de grelina no plasma se encontra bastante elevado em portadores de anorexia nervosa e retorna a níveis normais com ganho de peso e quando o indivíduo se recupera da doença (Tanaka *et al.*, 2003b). As concentrações de grelina também são elevadas em indivíduos com bulimia nervosa (Tanaka *et al.*, 2003a).

Administração de GH exógeno diminui a expressão do mRNA de grelina no estômago e a concentração de grelina no plasma, mas não afeta o estoque estomacal de grelina (Qi *et al.*, 2003). Estes achados sugerem que o GH pituitário exibe uma regulação *feedback* na produção estomacal de grelina.

#### **2.1.7. POLIMORFISMOS NO GENE DA GRELINA E OBESIDADE**

Em humanos, vários polimorfismos foram identificados no gene *GHRL*: várias mutações intrônicas foram encontradas (*rs35683*, *rs35682*, *rs2075356*, *rs35681*, *rs11923313*, *rs697228*, *rs11923293*, *rs9866514*, *rs42451*, *rs35680*, *rs35679*, *rs26802*) e três variações localizadas nos exons 2 (*R51Q* - *rs34911341* e *L72M* - *rs696217*) e 4 (*Q90L* - *rs4684677*). As frequências alélicas para os polimorfismos *R51Q* e *L72M* são similares em obesos e controles. Entretanto, foi relatado que obesos com o alelo *72M* adquirem a obesidade mais cedo do que os obesos homozigotos para o tipo selvagem *L72*, sugerindo que *L72M* deve afetar a atividade da grelina.

A mutação *R51Q* resulta numa mudança do sítio COOH-terminal responsável pela recomposição do peptídeo da grelina, resultando numa falha nessa recomposição que é necessária para produzir a grelina com 28 aminoácidos. Uma

pro-grelina com 94 aminoácidos de comprimento é produzida no lugar da normal, cuja atividade biológica ainda não foi avaliada. Ukkola *et al.* (2001) estudaram 96 mulheres obesas mórbidas ( $IMC = 42,3 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$ ) e 93 não obesas ( $IMC = 23 \pm 1,4 \text{ kg/m}^2$ ), sendo que a mutação *R51Q* foi identificada em seis heterozigotas obesas (6,3%) mas não entre os controles ( $p < 0,05$ ). Identificaram também a mutação *G274A* do intron 1 em duas obesas, que apresentaram também a mutação *L72M*, levando a sugerir que esse aparecimento conjunto possa ser devido a desequilíbrio de ligação.

As frequências genótípicas, quando se considerou a mutação *Q90L*, foram semelhantes entre indivíduos magros e obesos, levando à sugestão de que essa mutação não participa no processo de regulação do peso corporal (Hinney *et al.* 2002).



A obestatina, um hormônio derivado da pré-progrelina, possui 23 aminoácidos. A obestatina, como a grelina, parece que sofre uma modificação pós-tradicional, sendo modificada pela adição de um grupo amida na sua região carboxi-terminal numa glicina conservada entre as espécies (Gualillo *et al.* 2006). Ela possui função contrária a grelina, de saciedade e inibição de apetite.

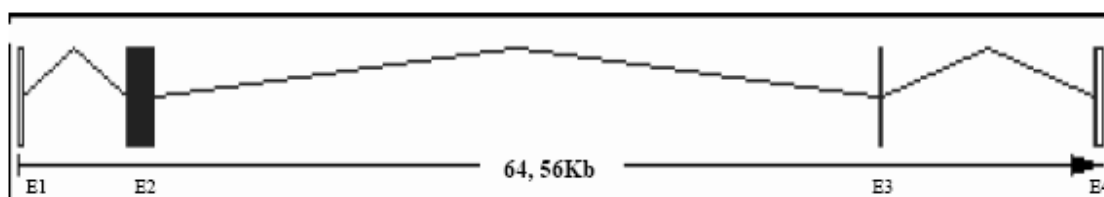
## **2.2. BUTIRILCOLINESTERASE**

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma enzima sérica produzida no fígado. Sua variabilidade é conhecida desde a década de 50 (Kalow and Staron, 1957), devido a sua capacidade de hidrolisar diversos ésteres de colina. Devido ao

fato de alguns ésteres serem usados como relaxantes musculares em procedimentos cirúrgicos, essas variantes foram identificadas mediante a incapacidade desses ésteres, em alguns casos, de atuar corretamente.

A estrutura da enzima BChE é codificada pelo gene *BCHE* (Arpagaus *et al.*, 1990) que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2). O gene *BCHE* tem 73 kb de comprimento e contém quatro exons (figura 3). Os primeiros alelos identificados nesse gene foram: *BCHE*\*U – usual, *BCHE*\*A e *BCHE*\*F. Estes alelos determinam enzimas com diferentes comportamentos frente a uma variedade de inibidores. Algumas variantes também foram identificadas devido à atividade ausente ou reduzida em relação à enzima usual. Atualmente, muitas variantes têm sido identificadas utilizando-se técnicas de análise de DNA.

Figura 4: Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons (E1, E2, E3 e E4) e os três introns. As estruturas  representam as regiões UTR e as estruturas  representam as regiões traduzidas.



Fonte: Nunes, K. **Haplótipos do gene *BCHE* da butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos**. Curitiba, 2006. 152f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

### 2.2.1. ORIGEM DO GENE *BCHE*



A sequência de aminoácidos da BChE humana tem 54% de identidade com a AChE (outra colinesterase) de *Torpedo californica* e *Torpedo marmorata*, duas espécies de arraia, e 38% de identidade com a AChE de *Drosophila melanogaster* (McTiernan *et al.*, 1987). O gene da AChE de *Torpedo* tem um grande exon que contém a maior parte da região codificadora, assim como ocorre no exon 2 do gene *BCHE* humano. Essa grande similaridade sugere que esses genes derivam de um ancestral comum.

Há uma grande similaridade entre o gene *BCHE* humano e o de vários outros mamíferos. A maior identidade, entre mamíferos, em relação ao polipeptídeo foi encontrada entre humanos e macacos, *Pan troglodytes*, (99,48%) e a menor entre humanos e camundongos, *Mus musculus*, (81,12%). As seqüências em torno do sítio ativo e do sítio aniônico estavam conservadas em vários animais (Nunes, 2006).

### **2.2.2. FORMAS MOLECULARES DA BChE**

A BChE do soro ou plasma, após eletroforese, pode aparecer sob cinco formas moleculares (Harris *et al.*, 1963) que, em ordem de peso molecular, são: C<sub>1</sub> (monômero), C<sub>2</sub> (monômero ligado à albumina sérica através de uma cisteína), C<sub>3</sub> (dímero), C<sub>4</sub> (tetrâmero) e C<sub>5</sub> (tetrâmero ligado a uma substância desconhecida). Esse complexo C<sub>5</sub> é formado pela interação dos genes *BCHE* e *CHE2*.

A banda C<sub>4</sub> é formada por quatro subunidades unidas por fortes ligações não covalentes, sendo que o conjunto é estabilizado pelas pontes dissulfeto inter-dímeros (Lockridge *et al.*, 1979). Cada tetrâmero contém quatro sítios ativos.

Após estimativas de massa molecular e sua relação com a cAa, identificou-se a banda C<sub>2</sub> como um heterodímero formado pela associação da banda C<sub>1</sub> com uma proteína com 65Kda através de uma ponte dissulfeto. Após eletroforese posterior à imunoabsorção para albumina, se nota que a banda C<sub>2</sub> não aparece, demonstrando que a imunoabsorção para albumina consegue remover a banda C<sub>2</sub>. Portanto, o resultado indica que a banda C<sub>2</sub> é um conjugado covalente entre o monômero C<sub>1</sub> e a albumina (Masson, 1989).

A variabilidade do loco *CHE2* afeta uma substância que se liga à *BCHE* (Masson, 1991). Esse polimorfismo é caracterizado de acordo com a presença ou a ausência de uma banda detectada em eletroforese denominada C<sub>5</sub>, cujo padrão de herança é autossômico dominante (Harris *et al.*, 1963). As frequências mais comuns desse alelo em populações caucasóides estão em torno de 5%.

Existem várias técnicas eletroforéticas para se detectar a banda C<sub>5</sub>, entretanto, a técnica de eletroforese em gel de ágar ácido (Van Ros e Vervoort, 1973, com modificações de Fadel-Picheth, 1991 e Souza, 1995) permite uma melhor separação entre a banda C<sub>5</sub>, que migra para o pólo positivo, e as demais formas moleculares da BChE que formam só uma banda com mobilidade para o pólo negativo.

A banda C<sub>4/5</sub> foi encontrada pela primeira vez por Souza (1995) quando tentava padronizar a técnica de eletroforese em gel de ágar ácido de Van Ros e Vervoort (1973), com modificações de Fadel-Picheth (1991) para posterior quantificação da banda C<sub>5</sub>.

Alcântara *et al.* (1999 e 2000) encontraram 12 bandas eletroforéticas em gel de poliacrilamida em nosso laboratório, sugerindo que a *BCHE* possa estar ligada a diversas outras substâncias.

O centro ativo da BChE é constituído por um sítio esterásico e um sítio aniônico. O sítio aniônico se liga com o grupo amônio quaternário (cAa positiva) da colina (Sussman *et al.*, 1991). Masson *et al.* (1996) demonstraram que o aminoácido mais importante para o sítio aniônico da *BCHE* é a Asp70 e que os aminoácidos aromáticos não são importantes para essa função.

### **2.2.3. VARIABILIDADE GENÉTICA**

#### **2.2.3.1. GENE *BCHE***

O alelo do gene *BCHE*, denominado usual, é o mais freqüente, e atípico (70G) foi o primeiro descrito (Kalow e Genest, 1957). Alguns dos fenótipos foram identificados usando-se inibidores diferenciais, que podem inibir em graus diferentes as variantes não usuais. Atualmente, devido ao conhecimento da seqüência e caracterização da estrutura desse gene, já é possível identificar as variantes pela análise do DNA. Em vista disso já foram descritas mais de 65 mutações nesse gene (Souza *et al.*, 2005b).

Kalow e Genest (1957) mostraram que a inibição pela dibucaína distinguia dois tipos de indivíduos, os sensíveis e os não sensíveis à inibição (determinadas respectivamente pelos alelos usual e atípico). Essa variante, denominada variante A, foi identificada molecularmente por McGuire *et al.* (1989), sendo que ela é

caracterizada por uma mutação de ponto no nucleotídeo 290, o que ocasiona uma modificação de ácido aspártico 70 (GAT) para glicina (GGT) no sítio aniônico.

Uma outra variante, resistente ao fluoreto, *BCHE\*F* foi identificada usando-se o fluoreto de sódio como inibidor diferencial (Harris e Whittaker, 1961). Posteriormente foram identificadas duas formas resistentes ao fluoreto: F-1 (243M), caracterizada por uma mutação de ponto que altera a treonina 243 (ACG) para Mionina (AIG) e F-2 (390V), caracterizada por uma mutação de ponto que altera a glicina 390 (GGT) para valina (GIT) (Nogueira *et al.*, 1992).

Outra variante, esta denominada de J, foi identificada por Garry *et al.* (1976). Essa variante é caracterizada por uma mutação que altera o ácido glutâmico 497 (GAA) para valina (GIA) (Bartels *et al.*, 1992a). Essa variante, encontrada em ligação absoluta com a variante K (Bartels *et al.*, 1992a), determina uma queda de 66% na enzima circulante e a um decréscimo correspondente na atividade enzimática.

A variante *K* (539T) foi descrita por Rubinstein *et al.* (1978) sendo caracterizada por uma mutação de ponto que causa uma substituição da alanina (GCA) para treonina (ACA) na posição 539 do exon 4, e também se verificou que a variante A, em 89% dos casos, encontra-se na conformação cis com a variante *K* (Bartels *et al.*, 1992b).

Estudos populacionais, baseados em análise do DNA, indicaram que a variante *K* é a mais freqüente dentre as variantes não usuais da *BCHE*. Bartels *et al.* (1992a) encontraram, em população norte-americana, uma freqüência de 12,8% para a variante *K*. Gaffney e Campbell (1994) observaram uma freqüência de 19,6% em

população escocesa. Shibuta *et al.* (1994) e Izumi *et al.* (1994) encontraram uma frequência de 16,4% e 17,5% em amostras de japoneses, respectivamente. Jensen *et al.* (1996), em população dinamarquesa, encontraram uma frequência de 18%. No Brasil, estudando amostras de brancos e miscigenados (brancos x negros), Souza *et al.* (1998) encontraram frequências de 18,4% e 17,1%, respectivamente.

As variantes consideradas como silenciosas levam à ausência total de atividade enzimática ou a uma diminuição de mais de 90% dessa atividade, em relação à do fenótipo usual. O primeiro caso de deficiência completa foi descrito por Liddel *et al.* (1962), revelando a existência de um homozigoto para alelo silencioso. Entretanto, mais tarde se observou heterogeneidade entre as variantes silenciosas (Goedde *et al.*, 1965, Scott e Wright, 1976). Pela análise de DNA, vários alelos silenciosos foram identificados (Nogueira *et al.*, 1990; Muratani *et al.*, 1991; Hada *et al.*, 1992; Hidaka *et al.*, 1992; Hidaka e Yuchi, 1995; Maekawa *et al.*, 1995 e 1997; Primo-Parmo, 1996; Sudo *et al.*, 1996 e 1997; Sakamoto *et al.*, 1998).

Existem, também, polimorfismos descritos fora da região codificadora da enzima madura, como as variantes no sítio -116 no exon 1, que leva à alteração de TGC para TAC, sendo que a frequência do alelo -116A, observada pelos autores que descreveram a mutação, foi igual a 8% (BARTELS *et al.*, 1990).

Furtado (2005) investigou em amostra de obesos (IMC  $\geq 30$ ) e controles de peso normal ( $20 \leq \text{IMC} < 25$ ) a presença do polimorfismo G→A nessa posição nt -116 no exon 1 do gene *BCHE*. Este estudo foi o primeiro relato da presença desse polimorfismo na população brasileira. A autora não verificou diferenças significativas entre as amostras de obesos e controles quanto às frequências do alelo -116A.

Neste mesmo trabalho, Furtado (2005) determinou a atividade da BChE em obesos classificados de acordo com o genótipo relativo aos alelos –116A e –116G do exon 1, e constatou que a mutação –116A está associada a uma diminuição da atividade da BChE. A autora também realizou análises levando em conta as mutações –116A e A539T, visto que as variações desses sítios estão em desequilíbrio de ligação (BARTELS et al., 1990). Foi observado que a atividade da BChE era menor somente quando os indivíduos portavam a mutação –116A.

#### **2.2.4. FUNÇÃO BIOLÓGICA DA BChE**

A BChE é encontrada nos principais sistemas corpóreos dos mamíferos, como massa branca do cérebro, sistema vascular, respiratório, digestório, urogenital e também em certas glândulas endócrinas e exócrinas. Entretanto sua função biológica ainda não foi claramente estabelecida, havendo sugestões de que esteja relacionada com o Metabolismo de lípidos, condução nervosa lenta e regulação dos níveis de colina e acetilcolina do plasma (revisão em Kutty, 1980 e Whittaker, 1980).

Vários fatores foram associados com alterações na atividade da BChE. Entre os que se referem a sua diminuição, encontram-se os estrógenos (Sidell e Kaminskis, 1975) e entre os que se relacionam com seu aumento, temos a hiperlipoproteinemia e a obesidade (revisão em Kutty, 1980), o diabetes (Antopol et al., 1937) e o alelo *CHE2*\*C5+, que determina cerca de 25% de aumento na atividade da BChE (Harris, 1980).

#### 2.2.4.1. RELAÇÃO DA BChE COM PESO, ALTURA E ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC)

Já foi encontrada correlação positiva entre a atividade da BChE e o peso corporal (Stueber-Odebrecht *et al.*, 1985). Chautard-Freire-Maia *et al.* (1990 e 1991) encontraram correlação positiva da atividade da BChE com peso em indivíduos CHE2 C5- e, posteriormente, em indivíduos CHE2 C5+ de banda fraca, sendo que o mesmo não ocorre em CHE2 C5+ de banda forte.

Também foi encontrada uma correlação positiva entre a atividade da BChE e o teor de gordura subcutânea (Berry *et al.*, 1954). Foi encontrada também um aumento da atividade da BChE em obesos e em hiperlipêmicos com peso normal (Cucuianu *et al.*, 1968).

A atividade da BChE mostrou-se correlacionada positivamente com peso e negativamente com altura, indicando aí sua correlação com o índice de massa corporal (Chautard-Freire-Maia, 1989).

Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991) verificaram que os indivíduos CHE2 C5+, com o complexo C<sub>5</sub> forte, apresentavam em média, significativamente, menor peso ( $64,66 \pm 0,73\text{kg}$ ) que os controles CHE2 C5- ( $70,59 \pm 0,97\text{kg}$ ). Esses resultados também foram verificados por Alcântara (2000) analisando essas relações com o IMC. Sendo que, para explicar-los, Alcântara *et al.* (2001) levantaram a hipótese de que a presença de C<sub>5</sub> numa proporção alta pode levar a uma estocagem menor de gordura.

Os dados diferenciais obtidos quanto ao IMC em pessoas CHE2 C5+ e CHE2 C5- foram indicativos da influência do loco *CHE2* no Metabolismo de lípidos. Em

obesos, o fenótipo CHE2 C5+ forte mostrou-se associado com menores valores médios de RCQ (razão cintura/quadril) e insulina. Locus condicionadores dessas variáveis podem ser moduladores da expressividade do complexo C<sub>5</sub>, sendo que o menor valor médio de insulina pode explicar a maior frequência de emagrecimento nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ forte. Esses também apresentaram uma tendência para maiores valores de creatinina, indicando maior massa corporal do que os indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ fraco (Alcântara, 2000).

Alcântara (2000) verificou uma maior frequência de bandas extras da BChE em obesos ( $2,20\% \pm 1,09\%$ ) do que na população geral ( $0,25\% \pm 0,14\%$ ;  $\chi^2 = 8,40$ ,  $p < 0,01$ ), sugerindo um papel do gene *BCHE* na determinação genética da obesidade.

Segundo Souza *et al.* (2005a), a *BCHE* pode estar relacionada com o Metabolismo de lípidos, uma vez que variantes do nucleotídeo *A539T* do gene *BCHE* afetam diferentemente a variância do IMC. Andrade *et al.* (2008), ampliando o estudo de Souza *et al.* (2005a), e determinando nessa mesma amostra os genótipos do gene *BCHE*, no que se refere ao nt -116 do exon 1, verificaram que o alelo -116A é necessário para o aumento da variância do IMC e deve ser o responsável pelo resultado obtido anteriormente, quando foram estudadas as variações do nt 1615, que se encontram em desequilíbrio de ligação com as do nt -116.

A interação do gene *BCHE* da butirilcolinesterase e do gene *CHE2*, que determina proteína ainda não identificada, condiciona o fenótipo CHE2 C5 +, associado com peso e IMC mais baixos do que o fenótipo CHE2 C5- (Chautard-Freire-Maia *et al.*, 1991; Alcântara *et al.*, 2001). A grelina, determinada pelo gene *GHRL*, só quando acilada ativa o receptor do segretagogo do *GH* (Kojima *et al.*,



2001). Em roedores, Tschöp *et al.* (2000) mostraram que a grelina causa aumento de peso pelo aumento da ingestão de alimento e redução na utilização da gordura. De Vriese *et al.* (2004) mostraram que a BChE do soro humano atua na desacilação da grelina. Considerando esses dados sobre a grelina, é possível explicar a associação negativa da atividade da BChE com IMC como devida ao papel dessa enzima na inativação da grelina. Assim, é esperado que o fenótipo CHE2 C5+, que determina cerca de 25% mais atividade da BChE, esteja associado com a diminuição do peso e do IMC, como relatado (Chautard-Freire Maia *et al.*, 1991; Alcântara *et al.*, 2001).

### **3. OBJETIVO GERAL**

- 1) Verificar o efeito conjunto de variações dos genes *BCHE* (condicionador da butirilcolinesterase) e *GHRL* (condicionador da grelina) no índice de massa corporal e na obesidade.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1) Determinar as frequências de variações do exon 2 (*R51Q*, *L72M*) do gene *GHRL* da grelina, em obesos e controles pareados.
- 2) Verificar se ocorre associação entre os polimorfismos do gene *GHRL* e a obesidade.
- 3) Verificar o efeito conjunto das variações do gene *GHRL* e do gene *BCHE* (exons 1 e 4), no que se refere à associação com obesidade.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

O material se refere a homens euro-brasileiros, doadores de sangue de Curitiba, classificados em 144 obesos ( $\text{IMC} \geq 30$ ) e 153 controles ( $20 \leq \text{IMC} < 25$ ), pareados por idade ( $t = 0,249$ ;  $p > 0,80$ ; tabela 1). A amostra desses obesos inclui os obesos mórbidos da amostra inicial de doadores de sangue ( $N = 3006$ ) e já consta com dados sobre a atividade da butirilcolinesterase e sobre os genótipos dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*.

**Tabela 1:** Médias ( $\pm$  D.P.) de idade e de índice de massa corporal (IMC) em controles e obesos

Amostras	n	Variáveis	Media $\pm$ D.P	Amplitude de Variação
Controles	153	Idade	36,31 $\pm$ 9,36	18 - 60
		IMC	23,10 $\pm$ 1,26	20,28 - 24,98
Obesos	144	Idade	36,59 $\pm$ 9,80	18 - 59
		IMC	32,93 $\pm$ 3,22	30,04 - 47,12

### 4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

#### 4.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA da amostra já tinha sido extraído, excetuando-se as amostras 2717 e 2056 as quais foram extraídas no decorrer da pesquisa, pelo método de *salting-out*

(Lahiri e Nurnberger, 1991) e estava estocado a  $-20^{\circ}$  C no Laboratório de Polimorfismos e Ligação. A Metodologia de análise de DNA é por PCR-SSCA (Single Strand Conformational Analysis). Com relação às mutações, localização e identificação, do gene *GHRL*, seguiu-se o protocolo de Hinney *et. al.* (2002).

#### 4.2.2. PCR

A solução de PCR contém 4  $\mu$ l de PCR SuperMix (Invitrogen), 1  $\mu$ l de DNA (cerca de 100ng), 10pmol de cada um dos iniciadores.

As condições da PCR são as seguintes:

1. Desnaturação inicial:  $94^{\circ}$  C por 5 minutos
2. Desnaturação:  $94^{\circ}$  C por 30 segundos;
3. Hibridização:  $48^{\circ}$  C por 30 segundos;
4. Extensão:  $72^{\circ}$  C por 30 segundos;
5. Ciclos: 35 (passos 2 a 4);
6. Extensão final:  $72^{\circ}$  C por 10 minutos.

Os iniciadores utilizados estão mostrados na tabela 2.

Após a PCR, foram misturados 5  $\mu$ l de DNA, já amplificado, a 5  $\mu$ l de solução de manutenção da fita simples (95% de formamida, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 10mM de EDTA e 10mM de NaOH). Esta solução foi submetida a  $94^{\circ}$ C por 5 minutos e imediatamente colocada no gelo, até sua aplicação no gel de poliacrilamida.

A técnica de SSCA (análise de conformação de fita simples) baseia-se na amplificação do DNA e posterior desnaturação por calor, gerando fitas simples. As

amostras resultantes são colocadas em gel de poliacrilamida. As fitas simples adquirem conformação tridimensional e podem correr em posições diferentes no gel. Uma simples mutação de ponto pode alterar essa conformação e, conseqüentemente, o padrão de bandas do fragmento.

**Tabela 2:** Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA na técnica de SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)

Iniciadores	Seqüência 5' → 3'	<i>Tamanho do fragmento (pb)</i>
<i>GHRL - gene da grelina</i>		
<i>GHRL15</i>	TCTCCCAGAGCACAAAGGAC	184
<i>GHRL13</i>	TTCTGCTTGACCTCCATCTTCC	
<i>GHRL25</i>	GGAGTCGAAGAAGCCACCA	138
<i>GHRL23</i>	CAGAAGCATAAACTGCAGAGG	
<i>BCHE – gene da butirilcolinesterase</i>		
E1F	CTGCTGCCAACTCTCGCGAG	203
E1R	CGAAGGTGTAAATTCAGAGC	
N45	CTGTGTAGTTAGAGAAAATG	258
<b>P43</b>	GAAAATATGTTCTATAAAGGG	

#### 4.2.3. ELETROFORESE

As condições de eletroforese para os fragmentos analisados (tabela 3) foram estabelecidas experimentalmente.

**Tabela 3:** Condições das eletroforeses de SSCA para os diferentes fragmentos dos genes *GHRL* e *BCHE*.

Fragmentos	Concentração de acrilamida %	% de bisacrilamida em relação à acrilamida	pH do tampão de preparo do gel	Pré-corrida (tempo; Volts)	Tempo de corrida (horas)
<i>GHRL</i>					
aa 51	10	3,4	8,20	1 h; 180	5:30
aa 72	8	3,4		1 h; 180	6
<i>BCHE</i>					
exon 1	10	2	8,20	30'; 100	20
exon 4	10	2	8,2	30'; 100	22

Para o fragmento de *GHRL*- aa 51, (figura 4) foi utilizada uma solução estoque de acrilamida 29:1 (29g de acrilamida; 1g de bisacrilamida; 5ml de glicerol, completar para 100 ml com água bidestilada).

A concentração final do gel foi de 10 %, e o tampão do gel foi o ácido (tampão Tris-HCl 33mM, pH 4,7). A corrida eletroforética consistiu em duas etapas, a primeira foi de 1:30 horas a 350 volts e 17mA e depois de 4 horas a 200 volts.

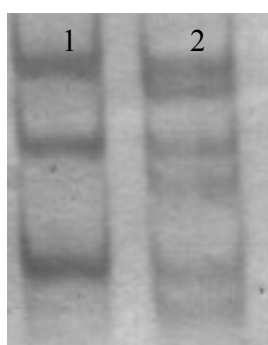


FIGURA 5: Gel de poliacrilamida 29:1, 10% descontínuo. Genótipos quanto ao gene *GHRL*: 1 – 51AA, 2 – 51AQ.

Para o fragmento *GHRL*- aa 72, (figura 5) foi utilizada uma solução estoque de acrilamida de 29:1 (29g de acrilamida; 1g de bisacrilamida; 5ml de glicerol, completar para 100 ml com água bidestilada).

A concentração final de acrilamida do gel foi de 8%, e o tampão do gel foi o básico (tampão TBE 1x, pH 8,2).

A corrida eletroforética foi realizada a 180 volts e 17mA, por um período de 6 horas.

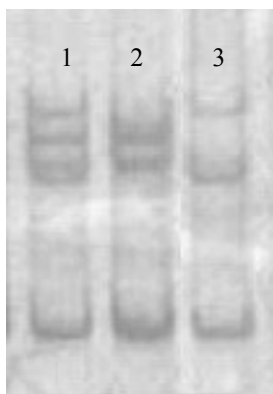


FIGURA 6: Gel de poliacrilamida 29:1, 8% contínuo. Genótipos quanto ao gene *GHRL*: 1 – 72LM, 2 – 72MM, 3 – 72LL.

Para o exon 1 da butirilcolinesterase foi utilizada uma solução estoque de acrilamida de 49:1 49g de acrilamida; 1g de bisacrilamida; 5ml de glicerol, completando para 100 ml com água bidestilada.

A concentração final de acrilamida do gel foi de 10%, e o tampão do gel foi o básico (tampão TBE 1x, pH 8,2).

A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e 13mA, por um período de 20 horas.

Para o exon 4 da butirilcolinesterase foi utilizada uma solução estoque de acrilamida de 49:1 49g de acrilamida; 1g de bisacrilamida; 5ml de glicerol, completando para 100 ml com água bidestilada.

A concentração final de acrilamida do gel foi de 10%, e o tampão do gel foi o básico (tampão TBE 1x, pH 8,2).

A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e 13mA, por um período de 22 horas.

A solução estoque de tampão TBE 5X é preparada com 54g de Tris, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5M (pH 8,0) e completar o volume para 1000 ml de água destilada.

Após a corrida, seguiu-se a coloração do gel com nitrato de prata (Budowle e cols., 1991). O gel foi lavado em solução de  $\text{HNO}_3$  a 1% por três minutos. Em seguida foi lavado três vezes com água destilada. O gel foi, então, coberto com solução de  $\text{AgNO}_3$  (2,02 g de  $\text{AgNO}_3$  em 1000 ml de água bidestilada) e colocado por 30 segundos no microondas. A solução de nitrato de prata foi retirada e o gel foi lavado três vezes com água destilada. A revelação foi feita com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (170 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 92  $\mu\text{l}$  de formaldeído), sendo preparada cinco minutos antes do uso. Um terço dessa solução foi despejada sobre o ge, que foi colocado no forno microondas por 30 segundos. O gel foi retirado do forno microondas e a solução enegrecida foi eliminada. O restante da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  foi despejada sobre o gel, que foi mantido em agitação até que aparecessem bandas. A solução foi, então, retirada e o gel foi lavado três vezes com água destilada. Depois, o gel foi subMido a uma solução de ácido acético a 10% por dez minutos e após esse tempo a solução



foi retirada e o gel foi lavado três vezes com água destilada. Após esse processo, o gel foi subMido a uma solução de glicerol a 5% por 7 minutos. Por fim, o gel foi mergulhado em uma solução de Manol 30% e glicerol 1% sendo, juntamente com ele, mergulhado também papel celofane transparente, o qual foi estirado sendo o gel colocado em cima do mesmo, coberto com um papel filtro e guardado no meio de duas placas de vidro até que fosse escaneado.

#### **4.3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS**

As freqüências alélicas foram obtidas pelo método de contagem direta.

As análises estatísticas (médias, freqüências, teste  $t$ , teste  $F$ , teste  $\chi^2$ , teste exato de Fisher, coeficiente de correlação etc.) foram realizadas com o uso do programa STATISTICA for Windows (Statsoft, Inc. 1996).

Foram comparadas as médias dos diferentes genótipos em obesos e controles, no que se refere ao IMC, idade e atividade da butirilcolinesterase, considerando-se os sítios do gene *GHRL* codificantes dos aminoácidos 51 e 72. Sempre que as variâncias diferiram estatisticamente, aplicou-se o teste- $t$  para variâncias separadas.

Foi feita uma análise de regressão múltipla escalonada, tendo a atividade da butirilcolinesterase como variável dependente. Nessa análise, as variáveis independentes foram: idade, IMC, exons 1 e 4 do gene *BCHE* e a região do gene *GHRL* codificadora do aminoácido 72. Os códigos adotados para os genótipos foram os seguintes: exon 1 do gene *BCHE* (1 = -116GG, 2 = -116GA, 3 = -116AA); exon 4

do gene *BCHE* (1 = 539AA, 2 = 539AT, 3 = 539TT); região do gene *GHRL* codificadora do aminoácido 72 (1 = 72LL e 2 = 72LM + 72MM).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 VARIABILIDADE DO GENE *GHRL*

Com relação ao sítio do gene *GHRL*, codificador do aminoácido 51 (*R51Q*), os resultados obtidos quanto às frequências genotípicas estão dispostos na tabela 4.

**Tabela 4:** Frequências genotípicas quanto ao sítio do gene *GHRL* codificador do aminoácido 51.

Genótipos	Obesos		Controles	
	N	%	N	%
<i>51AA</i>	141	99,30	151	98,69
<i>51AQ</i>	1	0,70	2	1,31
<i>51QQ</i>	0	0,00	0	0,00
Total	142	100,00	153	100,00
Comparação	$\chi^2 = 0,004$ ; $p > 0,90$			

A tabela 5 mostra os dados referentes às frequências genotípicas do sítio do gene *GHRL*, codificador do aminoácido 72 (*L72M*).

**Tabela 5:** Frequências genotípicas quanto ao sítio do gene *GHRL* codificador do aminoácido 72.

Genótipos	Obesos		Controles	
	N	%	N	%
<i>72LL</i>	126	88,11	134	87,58
<i>72LM</i>	16	11,19	18	11,77
<i>72MM</i>	1	0,70	1	0,65
Total	143	100,00	153	100,00
Comparação	$\chi^2 = 0,026$ ; $p > 0,95$			

A tabela 6 mostra os dados de frequências alélicas para o gene *GHRL*, considerando-se separadamente os dois sítios estudados.

**Tabela 6:** Frequências alélicas (%) do gene *GHRL*.

Amostras	GHRL			
	51A	51Q	72L	72M
Controles	99,35% ± 0,46%	0,65% ± 0,46%	93,46% ± 1,41%	6,54% ± 1,41%
Obesos	99,65% ± 0,35%	0,35% ± 0,35%	93,71% ± 1,42%	6,29% ± 1,42%
Comparações	$\chi^2 = 0,26$ ; $p > 0,60$		$\chi^2 = 0,01$ ; $p > 0,90$	

Considerando-se que os grupos de obesos e controles não diferiram quanto às frequências genotípicas e alélicas desses dois sítios do gene *GHRL*, na tabela 7 foram reunidos esses grupos, de modo a se constituir uma amostra predominantemente de descendência européia, referente à cidade de Curitiba. Na tabela 7, são mostradas as distribuições genotípicas totais e os resultados de comparações com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na tabela 8, são mostradas as respectivas frequências alélicas.

**Tabela 7:** Frequências genotípicas para o gene *GHRL* (N = 295, aa51; N = 296, aa72), referente à amostra total de descendentes de europeus de Curitiba, com respectivos valores de  $\chi^2$  em relação à comparação com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

<i>Genótipos do gene GHRL</i>											
51AA		51AQ		51QQ		72LL		72LM		72MM	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
292	98,98	3	1,02	0	0,0	260	87,84	34	11,48	2	0,68
$\chi^2 = 0,002$ ; $p > 0,90$						$\chi^2 = 0,201$ ; $p > 0,50$					

**Tabela 8:** Frequências alélicas de variantes de dois sítios do gene *GHRL* na amostra total de descendentes de europeus de Curitiba.

Gene <i>GHRL</i> da grelina			
Alelo	% ± E.P.	Alelo	% ± E.P.
51A	99,49 ± 0,29	72L	93,58 ± 1,01
51Q	0,51 ± 0,29	72M	6,42 ± 1,01

As tabelas 9 e 10 mostram os dados de distribuição dos genótipos de controles e obesos, respectivamente, considerando-se os genes *GHRL* da grelina e *BCHE* da butirilcolinesterase.

**Tabela 9:** Distribuição de frequência dos genótipos de controles quanto aos genes *GHRL* da grelina e *BCHE* da butirilcolinesterase.

Genótipos			
<i>GHRL</i>	<i>BCHE</i>		
51;72	-116; 539	N	%
51AA; 72LL	-116GG; 539AA	81	55,48
51AA; 72LL	-116GG; 539AT	23	15,75
51AA; 72LL	-116GG; 539TT	3	2,05
51AA; 72LL	-116GA; 539AA	2	1,37
51AA; 72LL	-116GA; 539AT	17	11,64
51AA; 72LL	-116GA; 539TT	2	1,37
51AA; 72LL	-116AA; 539TT	1	0,68
51AA; 72LM	-116GG; 539AA	8	5,48
51AA; 72LM	-116GG; 539AT	2	1,37
51AA; 72LM	-116GA; 539AA	1	0,68
51AA; 72LM	-116GA; 539AT	1	0,68
51AA; 72LM	-116GA; 539TT	2	1,37
51AA; 72MM	-116GG; 539AA	1	0,68
51AQ; 72LL	-116GG; 539AT	1	0,68
51AQ; 72LM	-116GG; 539AA	1	0,68
Totais		146	100%

**Tabela 10:** Distribuição de freqüência dos genótipos de obesos quanto aos genes *GHRL* da grelina e *BCHE* da butirilcolinesterase.

Genótipos		<i>N</i>	%
<i>GHRL</i>	<i>BCHE</i>		
<i>51;72</i>	<i>-116; 539</i>		
<i>51AA; 72LL</i>	<i>-116GG; 539AA</i>	77	59,23
<i>51AA; 72LL</i>	<i>-116GG; 539AT</i>	15	11,54
<i>51AA; 72LL</i>	<i>-116GG; 539TT</i>	3	2,31
<i>51AA; 72LL</i>	<i>-116GA; 539AT</i>	17	13,08
<i>51AA; 72LL</i>	<i>-116GA; 539TT</i>	2	1,54
<i>51AA; 72LM</i>	<i>-116GG; 539AA</i>	6	4,61
<i>51AA; 72LM</i>	<i>-116GG; 539AT</i>	6	4,61
<i>51AA; 72LM</i>	<i>-116GA; 539AT</i>	2	1,54
<i>51AA; 72MM</i>	<i>-116GG; 539AA</i>	1	0,77
<i>51AQ; 72LL</i>	<i>-116GA; 539TT</i>	1	0,77
Totais		130	100,00%

## 5.2. ÍNDICE DE MASSA CORPORAL, IDADE E ATIVIDADE.

As tabelas 11 e 12 mostram dados referentes a idade, IMC e atividade da butirilcolinesterase em controles e obesos, respectivamente, classificados quanto aos genótipos de *L72M*. Tanto em obesos como em controles, a variância da distribuição da atividade da BChE é maior, com diferença estatisticamente significativa, em indivíduos com o alelo *72M*, quando comparado com os que não o possuem.

**Tabela 11:** Dados de idade, índice de massa corporal (IMC) e atividade da butirilcolinesterase de controles, classificados quanto ao aminoácido 72 codificado pelo gene *GHRL* da grelina.

GHRL (aa72)									
Genótipos	Idade			IMC			Atividade da BChE (KU/L)		
	n	Média ± D.P.	S <sup>2</sup>	n	Média ± D.P.	S <sup>2</sup>	n	Média ± D.P.	S <sup>2</sup>
72LL	134	36,00 ± 9,39	88,14	134	23,05 ± 1,29	1,653	131	4,64 ± 1,31	1,71
72LM +72MM	19	38,53 ± 9,08	82,37	19	23,43 ± 0,96	0,923	18	4,92 ± 2,07	4,28
<b>Testes</b>		t = 1,10, > 0,20	p F = 1,07, p > 0,90		t = 1,22, > 0,20	p F = 1,79, p > 0,90		t = 0,57, p > 0,10	F = 2,50, p < 0,05

**Tabela 12:** Dados de idade, índice de massa corporal (IMC) e atividade da butirilcolinesterase de obesos, classificados quanto ao aminoácido 72 codificado pelo gene *GHRL*.

GHRL (aa72)									
Genótipos	Idade			IMC			Atividade da BChE (KU/L)		
	n	Média ± D.P.	S <sup>2</sup>	n	Média ± D.P.	S <sup>2</sup>	n	Média ± D.P.	S <sup>2</sup>
72LL	126	36,99 ± 9,92	98,41	126	32,95 ± 3,29	10,86	121	6,30 ± 2,71	7,32
72LM +72MM	17	33,71 ± 8,86	78,47	17	32,90 ± 2,7	7,28	15	7,99 ± 3,97	15,76
<b>Testes</b>		t = 1,30, > 0,15	p F = 1,25; p > 0,60		t = 0,06, > 0,95	p F = 1,49; p > 0,35		t = 1,60, > 0,10	p F = 2,15; p < 0,05

Em obesos, classificados pelos genótipos mais comuns quanto aos genes *GHRL* e *BCHE* (ver tabela 10), foram feitas comparações entre as médias do IMC, como mostra a Tabela 13, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos 72LL e 72LM+72MM.

**Tabela 13.** Médias de índice de massa corporal  $\pm$  erros padrões, em obesos classificados pelos genótipos dos genes da butirilcolinesterase e da grelina.

Genótipos do gene da grelina	Média do IMC $\pm$ Erro Padrão		
	Genótipos do gene da butirilcolinesterase -116GG;539AA	-116GG;539AT	-116GA;539AT
72LL	32,9 $\pm$ 0,6	31,8 $\pm$ 0,4	33,4 $\pm$ 0,6
72LM+72MM	33,7 $\pm$ 1,4	32,4 $\pm$ 0,6	33,7 $\pm$ 0,4
Teste t	0,67	0,86	0,16
p	> 0,50	> 0,40	> 0,85

A tabela 14 mostra comparação entre as médias da atividade da butirilcolinesterase, quando se comparam todos os obesos e controles, mostrando que obesos apresentam uma atividade mais alta da BChE do que os controles, sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa.

**Tabela 14:** Média ( $\pm$  D.P.) da atividade (KU/L) da butirilcolinesterase em controles e obesos.

Amostras	N	Média $\pm$ D.P.
Controles	149	4,67 $\pm$ 1,42
Obesos	137	6,47 $\pm$ 3,00
Teste-t		$t = 6,58$ ; $p < 0,001$

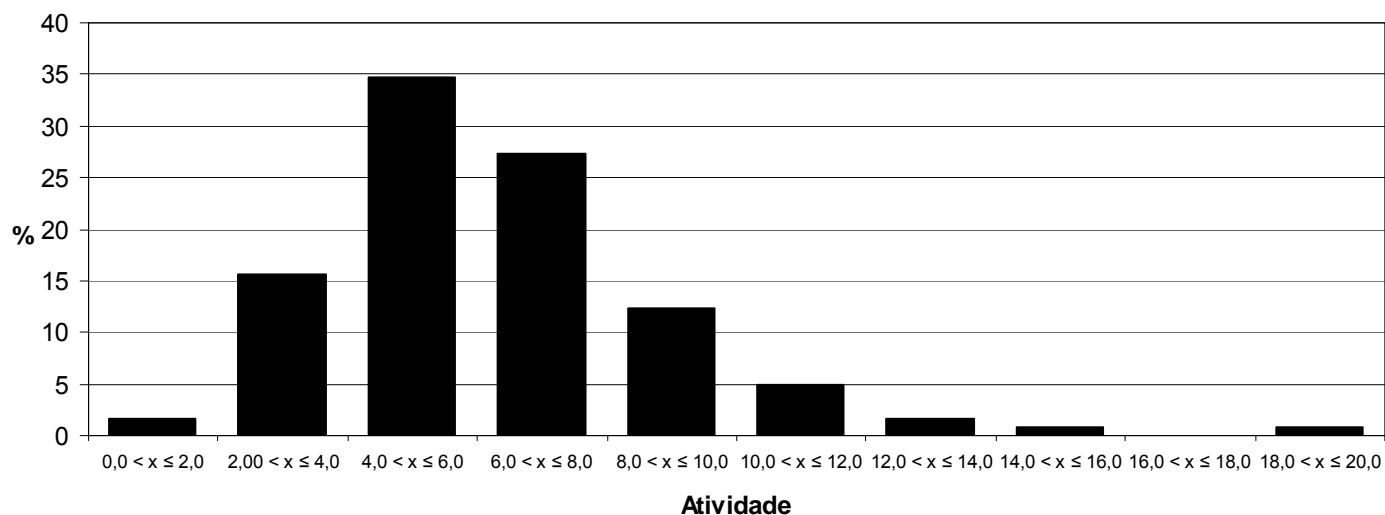
A tabela 15 mostra dados de distribuição de frequência da atividade da butirilcolinesterase, em intervalos classe, considerando-se obesos homozigotos para o alelo 72L do gene *GHRL*. O gráfico 1 ilustra os dados da tabela 15.



**Tabela 15:** Distribuição de frequência da atividade da butirilcolinesterase em 121 obesos homozigotos para o alelo 72L.

Atividade (KU/L)	N	(%)
$0,0 < x \leq 2,0$	2	1,65
$2,00 < x \leq 4,0$	19	15,70
$4,0 < x \leq 6,0$	42	34,71
$6,0 < x \leq 8,0$	33	27,27
$8,0 < x \leq 10,0$	15	12,40
$10,0 < x \leq 12,0$	6	4,96
$12,0 < x \leq 14,0$	2	1,65
$14,0 < x \leq 16,0$	1	0,83
$16,0 < x \leq 18,0$	0	0
$18,0 < x \leq 20,0$	1	0,83

**Figura 7:** Frequências de homozigotos para o alelo 72L, distribuídas segundo o nível de atividade da butirilcolinesterase.

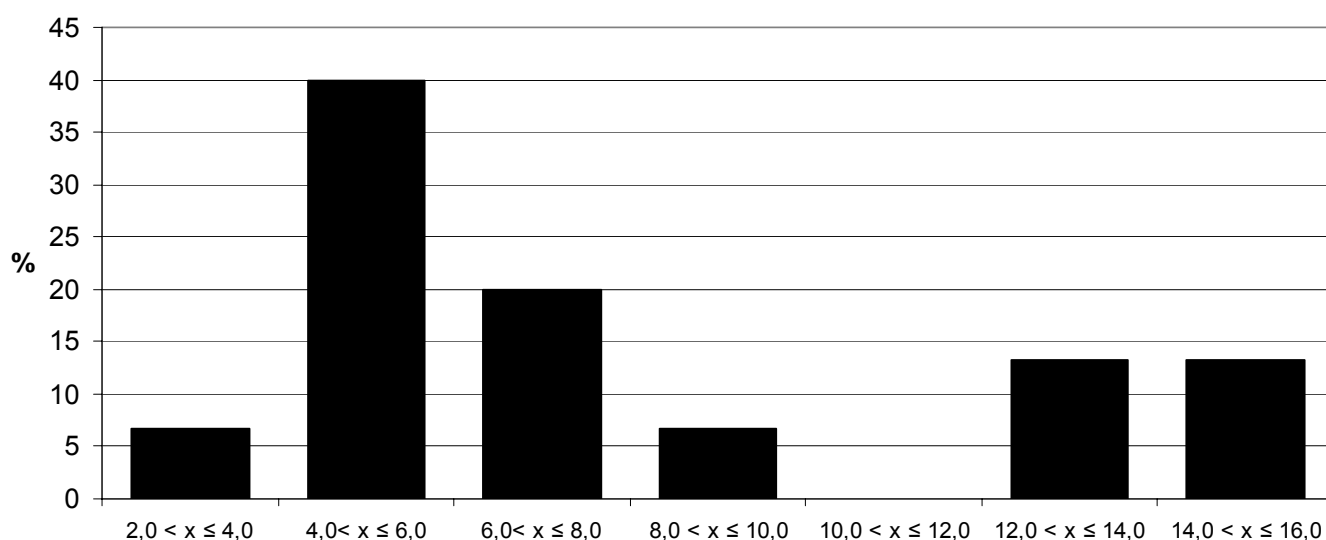


A tabela 16 mostra os dados de distribuição de frequência da atividade da butirilcolinesterase, em intervalos classe, considerando-se obesos com o alelo 72M em hetero ou em homozigose. O gráfico 2 ilustra os dados da tabela 16.

**Tabela 16:** Distribuição de frequência da atividade da butirilcolinesterase em 15 obesos com a variante 72M em hetero ou homozigose.

Atividade (KU/L)	N	(%)
$2,0 < x \leq 4,0$	1	6,67
$4,0 < x \leq 6,0$	6	40,00
$6,0 < x \leq 8,0$	3	20,00
$8,0 < x \leq 10,0$	1	6,67
$10,0 < x \leq 12,0$	0	0
$12,0 < x \leq 14,0$	2	13,33
$14,0 < x \leq 16,0$	2	13,33

**Figura 8:** Frequências de homozigotos e heterozigotos para o alelo 72M, distribuídas segundo o nível de atividade da butirilcolinesterase.



Observa-se que em obesos homozigotos para o alelo *72L*, cerca de 20,7% possuem atividade da BChE acima de 8KU/L, enquanto nos obesos homo ou heterozigotos para o alelo *72M*, cerca de 33,3% possuem atividade acima desse valor. Para detalhar esses resultados, elaborou-se a tabela 17, que mostra dados dos cinco obesos que possuem o alelo *72M* e a atividade da *BCHE* acima de 8 KU/L.

**Tabela 17:** Dados dos cinco obesos que possuem o alelo *72M* do gene *GHRL* e que apresentam os maiores níveis de atividade da butirilcolinesterase.

Identificação	Idade	IMC	Atividade (KU/L)	GHRL
1714	37	32,39	15,09	<i>72LM</i>
1692	31	41,00	8,61	<i>72LM</i>
1576	44	31,64	12,94	<i>72LM</i>
1435	35	35,92	13,93	<i>72MM</i>
1173	30	30,48	14,32	<i>72LM</i>

As tabelas 18 e 19 mostram coeficientes de correlação entre as variantes do aminoácido 72, codificado pelo gene *GHRL*, com as variáveis idade, IMC, atividade da BChE (KU/L), variantes dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*, em controles e obesos, respectivamente. Os códigos utilizados para as análises foram: para o exon 1 (1 = -116GG, 2 = -116GA, 3 = -116AA), para o exon 4 (1 = 539AA, 2 = 539AT, 3 = 539TT) do gene *BCHE*. Para o gene *GHRL* foram utilizados os códigos: 1 = *72LL* e 2 = *72LM* + *72MM*.

**Tabela 18:** Coeficientes de correlação das variáveis idade, IMC, atividade da butirilcolinesterase, exon 1 e exon 4 do gene *BCHE* em relação à variável aminoácido 72, codificada pelo gene *GHRL*, em 144 controles.

		Idade	IMC	Butirilcolinesterase	Gene BCHE	
				Atividade	Exon 1	Exon 4
<i>GHRL</i> – aa 72	r	0,088	0,066	0,061	0,061	0,021
	p	0,293	0,433	0,471	0,467	0,802

**Tabela 19:** Coeficientes de correlação das variáveis idade, IMC, atividade da butirilcolinesterase, exon 1 e exon 4 do gene *BCHE* em relação à variável aminoácido 72, codificada pelo gene *GHRL*, em 130 obesos.

		Idade	IMC	Butirilcolinesterase	Gene BCHE	
				Atividade	Exon 1	Exon 4
<i>GHRL</i> – aa 72	r	-0,115	0,048	0,185	-0,035	0,084
	p	0,194	0,589	0,035	0,696	0,345

O único coeficiente de correlação significativo ( $r = 0,185$ ;  $p < 0,05$ ) foi encontrado entre as variáveis atividade da BChE e o gene *GHRL* (aa 72) de obesos, indicando que os genótipos com a presença do alelo *72M* tendem a possuir atividade mais alta da BChE do que os homozigotos selvagens.

A tabela 20 mostra os dados da análise de regressão múltipla escalonada em 130 obesos, que teve como variável dependente a atividade da BChE e como variáveis independentes os exons 1 e 4 do gene *BCHE*, a idade, o IMC, e o aminoácido 72, codificado pelo gene *GHRL*. O modelo mais econômico de regressão múltipla confirmou os resultados obtidos pela correlação simples, indicando correlação significativa entre atividade da BChE e genótipos do gene *GHRL*, além de mostrar a influência das variações do sítio -116 do exon 1 do gene *BCHE*, mostrando que os genótipos com a variante -116A tendem a ter menor atividade dessa enzima.

**Tabela 20:** Resultados da análise de regressão múltipla escalonada, referentes à amostra de obesos (N = 130), considerando-se a atividade da butirilcolinesterase como variável dependente (Y)

$Y \pm D.P. = 6,47 \pm 2,95$		Intercepto $\pm E.P. = 6,62 \pm 1,22$		
Variáveis independentes	M $\pm$ D.P.	b $\pm$ E.P.	t	p
Exon 1	1,17 $\pm$ 0,38	-1,67 $\pm$ 0,67	2,51	< 0,013
GHRL – aa72	1,12 $\pm$ 0,32	1,63 $\pm$ 0,78	2,09	< 0,039
<i>Análise de variância</i>				
Fontes de variação	G.L.	Soma dos quadrados	F	r <sup>2</sup>
Regressão	2	89,62	5,52	0,080
Resíduo	127	1030,31	P < 0,05	
Total	129	1119,93		

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DE R51Q E L72M

Nos 295 doadores de sangue analisados no presente estudo para R51Q, foram encontrados apenas 3 heterozigotos para o alelo 51Q (dois controles e um obeso), de modo que não houve diferenças entre as frequências genotípicas e alélicas, quando se compararam obesos e controles (tabelas 4 e 6).

Os dados obtidos pelo presente estudo são comparados com os de Ukkola *et. al.* (2001), quanto às frequências genotípicas (tabela 22) e alélicas (tabela 23), mostrando que em três comparações não houve diferença entre as amostras de obesos e controles utilizadas pelos dois estudos. Isso pode ser devido ao fato de o presente estudo utilizar amostras de brasileiros descendentes de europeus, assim como o estudo realizado por Ukkola *et. al.* (2001), que estudou uma amostra da população sueca. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os dois estudos, quando se compararam as frequências genotípicas e alélicas de obesos, sendo que as frequências do presente estudo em relação a 51Q são significativamente menores que as encontradas por Ukkola *et. al.* (2001). Em relação a esses dados, pode-se ressaltar que a média de IMC da amostra de obesos de Ukkola *et. al.* (2001) é  $42,3 \pm 3,4$ , enquanto que a do presente estudo é  $32,9 \pm 3,4$ , no que se refere aos 142 obesos genotipados para R51Q. Comparando-se essas médias pelo teste t, verifica-se que a média de IMC dos obesos do presente estudo é estatisticamente menor ( $t = 21,36$ ;  $p < 0,001$ ). Como Ukkola *et. al.* (2001) só

encontraram a variante 51Q em obesos mórbidos, é possível que se obtenha uma frequência mais alta desse alelo do que a encontrada no presente estudo, se for considerada uma amostra brasileira com IMC maior.

Nos 296 indivíduos estudados no presente estudo para *L72M* não houve diferenças entre as frequências genotípicas e alélicas, quando se compararam obesos e controles (tabelas 5 e 6). Comparando esses dados com os obtidos por Ukkola *et. al.* (2001) também não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os dois estudos, tanto em obesos como em controles, considerando-se as frequências genotípicas e alélicas (tabelas 22 e 23, respectivamente).

**Tabela 21:** Comparações entre as frequências genotípicas de dois sítios do gene *GHRL* entre o presente estudo e o realizado por Ukkola *et. al.* (2001)\*.

Estudos	Frequências ± E. P. (%) dos genótipos do gene GHRL			
	<i>Aminoácido 51</i>		<i>Aminoácido 72</i>	
	51AA	51AQ + 51QQ	72LL	72LM + 72MM
<b>Controles</b>				
Presente estudo	98,69 ± 0,92 (151)	1,31 ± 0,92 (2)	87,58 ± 2,67 (134)	12,42 ± 2,67 (19)
Ukkola at. al. (2001)	100,00 ± 0,00 (96)	0,00 ± 0,00 (0)	87,50 ± 3,38 (84)	12, 50 ± 3,38 (12)
p (teste exato de Fisher)	> 0,50		> 0,99	
<b>Obesos</b>				
Presente estudo	99,30 ± 0,70 (141)	0,70 ± 0,70 (1)	88,11 ± 2,71 (126)	11,89 ± 2,71 (17)
Ukkola et. al. (2001)	93,75 ± 2,47 (90)	6,25 ± 2,47 (6)	84,38 ± 3,71 (81)	15,63 ± 3,71 (15)
p (teste exato de Fisher)	< 0,05		> 0,40	

\* Valores de N entre parênteses.

**Tabela 22:** Comparações entre as frequências alélicas de dois sítios do gene *GHRL* entre o presente estudo e o realizado por Ukkola *et. al.* (2001).

Estudos	% ± E.P.			
	Controles		Obesos	
	51Q	72M	51Q	72M
Presente estudo	0,65 ± 0,46	6,54 ± 1,41	0,35 ± 0,35	6,29 ± 1,42
Ukkola <i>et. al.</i> (2001)	0,00 ± 0,00	6,25 ± 1,75	3,13 ± 1,25	9,38 ± 2,11
p (teste exato de Fisher)	> 0,50	> 0,99	< 0,05	> 0,20

Comparando as frequências alélicas obtidas pelo presente estudo com as disponíveis no *HAPMAP* ([http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap\\_B35/?name=chr3:1036457..1036457](http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B35/?name=chr3:1036457..1036457)), para a variação *L72M*, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os dados obtidos quanto a análise da população de UTAH ( $\chi^2 = 0,58$ ,  $p > 0,4$ ). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando comparadas as frequências obtidas pelo presente estudo com as das populações: Chinesas ( $\chi^2 = 9,26$ ,  $p < 0,05$ ), Japonesa ( $\chi^2 = 14,5$ ,  $p < 0,05$ ) e Africana ( $\chi^2 = 4,98$ ,  $p < 0,05$ ) disponíveis no site *HAPMAP*.

Quanto à variação *R51Q*, os dados obtidos foram comparados com os disponíveis no *NCBI* (*SNP*, [H:\Reference SNP\(refSNP\) Cluster Report rs34911341.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/ReferenceSNP(refSNP)ClusterReport/rs34911341.htm)) e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa com a população de afro-americanos disponível ( $\chi^2 = 0,69$ ,  $p > 0,4$ ).

## 6.2. VARIAÇÃO *R51Q* DO GENE *GHRL* E *IMC*

Segundo Kojima e Kangawa (2005) o aminoácido 51 é o último aminoácido da grelina madura, localizado na porção COOH – terminal, sendo a trinca



correspondente de DNA importante para a correta ocorrência da recomposição alternativa. Quando a mutação ocorre e o aminoácido muda de Aina para glutamina, a recomposição alternativa fica prejudicada, gerando então uma proteína aberrante com 94 aminoácidos ao invés da proteína normal com 28 aminoácidos. O 28º aminoácido é o 51º da pró-grelina.

Ukkola *et. al.* (2001) reportaram a presença do alelo mutante em 6 heterozigotos de uma amostra de 96 obesos mórbidos (média de IMC =  $42,3 \pm 3,4$  Kg/m<sup>2</sup>) e sua ausência em controles ( $p < 0,05$ ). No entanto, o presente estudo encontrou 2 controles com o alelo mutante 51Q em heterozigose e 1 heterozigoto em obesos ( $p > 0,90$ ). De acordo com Kojima e Kangawa (2005), apesar de ser encontrada associação entre a variação do aminoácido 51 de Aina para glutamina com um defeito na recomposição alternativa, ainda não está claro que esta mutação de fato altere a atividade ou as propriedades biológicas da grelina.

O número reduzido de heterozigotos encontrados no presente estudo impossibilitou a realização das análises estatísticas comparativas entre a variação R51Q do gene *GHRL* com o IMC, isoladamente, e em conjunto com as variações dos exons 1 e 4 do gene *BCHE*. Sugerimos um estudo mais amplo com uma amostra com média de IMC mais elevada, que possa incluir muitos obesos mórbidos ( $\text{IMC} \geq 40$  Kg/m<sup>2</sup>).

### **6.3. VARIAÇÃO L72M DO GENE GHRL E IMC**

O presente estudo não encontrou nenhuma associação entre a variação L72M e o IMC tanto em controles ( $t = 1,22$ ,  $p > 0,20$ ) como em obesos ( $t = 0,06$ ,  $p > 0,95$ ),

quando se compararam os genótipos *72LL* e *72LM* + *72MM* (tabelas 11 e 12, respectivamente).

Os presentes dados corroboram os de estudos anteriores (Ukkola *et. al.*, 2001; Hinney *et. al.* 2002), que também não encontraram associação entre a frequência do alelo mutante *72M* e a obesidade. É interessante notar que a variação *L72M* ocorre numa região não codificadora do gene *GHRL* (Ukkola *et. al.*, 2001).

Além disso, o presente estudo também não encontrou diferença entre as médias de IMC, quando se compararam os genótipos *72LL* e *72LM+72MM* em obesos, classificados quanto aos genótipos dos exons 1 e 4 do gene *BCHE* (tabela 13), indicando que essas variações do gene *BCHE* não alteram o comportamento desses genótipos de *GHRL*, quanto ao IMC.

#### **6.4. VARIAÇÃO *L72M* DO GENE *GHRL* E IDADE DE INÍCIO DA OBESIDADE**

De acordo com Kojima e Kangawa (2005) e Ukkola *et. al.* (2001), apesar de a variação *L72M* não estar presente na região codificadora da proteína grelina, o alelo mutante *72M* induz a uma obesidade mais precoce.

Ukkola *et. al.* (2001) reportaram que, indivíduos com o genótipo *72LM* tendem a se tornarem obesos mais cedo ( $15,6 \pm 7,9$  anos) do que homozigotos *72LL* ( $20,5 \pm 10,5$  anos;  $0,1 > p > 0,05$ ) e que o início da obesidade ainda é mais precoce em homozigotos *72MM* ( $13,7 \pm 3,2$  anos), sugerindo que o alelo *72M* tenha um efeito na manifestação precoce da obesidade.

O presente estudo não foi elaborado no sentido de obter informações sobre a idade de início da obesidade, tendo sido apenas registrada a idade no momento da

doação de sangue. Não foi encontrada associação entre a presença do alelo mutante *72M* e a idade dos obesos ( $t = 1,30$ ,  $p > 0,15$ ). No entanto, na tabela 12, nota-se que a idade média de 17 obesos com *72M* é 33,7, enquanto que nos 126 homozigotos *72LL* é 36,99, estando no sentido dos dados obtidos por Ukkola *et. al.* (2001). É possível que, numa amostra com número maior de portadores de *72M*, pudesse ser obtida diferença entre as médias de idade dos dois grupos.

Quando se realizou, entre os obesos, análises de correlação entre a variação *L72M* e as variáveis idade, IMC, atividade da *BCHE* e variantes dos exons 1 e 4 do gene *BCHE* (tabela 19), mais uma vez não foi encontrada correlação entre *L72M* e idade, porém a presença do alelo *72M* está no sentido de associação negativa com a idade ( $r = - 0,115$ ,  $p = 0,19$ ).

#### **6.5. VARIAÇÃO *L72M* DO GENE *GHRL* E ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE**

A variância da atividade da *BChE* foi significativamente maior no genótipo *72LM* + *72MM*, quando comparado com o *72LL*, tanto em obesos como em controles, indicando relação da variação *72M* com a distribuição da atividade dessa enzima.

Além desses dados, em obesos também foi encontrado coeficiente de correlação positivo (tabela 19) entre a atividade da *BChE* e a presença do alelo *72M* do gene *GHRL*. As distribuições das freqüências dos indivíduos *72LL* (tabela 15) e *72LM*+*72MM* (tabela 16) com relação à atividade da butirilcolinesterase mostram que aqueles com atividade relativamente alta da *BCHE* ( $> 8,00$  KU/L) representam 20,7%

no caso do genótipo *72LL* e 33,3% em *72LM* + *72MM* (Figuras 7 e 8), ilustrando essa tendência entre o alelo *72M* e atividade mais alta da BChE .

É interessante salientar que as médias da atividade da BChE, em obesos, não diferiram significativamente entre os genótipos, pois em vista das variâncias serem estatisticamente diferentes, foi utilizado o teste *t* que considera as variâncias em separado, de acordo com Blalock (1972). O teste *t* sem essa consideração seria significativo ( $t = 2,15$ ,  $p < 0,05$ ), de modo que é possível que, em amostra de maior tamanho, as médias de atividade da BChE difiram entre os genótipos considerados, quando comparados por teste *t*.

Em controles, o coeficiente de correlação entre *L72M* e atividade da *BChE* (tabela 18) não foi significativo ( $r = 0,061$ ;  $p > 0,40$ ), sugerindo que a relação entre *72M* e atividade da BChE parece ser um fenômeno exclusivo de obesos.

O modelo mais econômico de regressão múltipla confirmou os resultados obtidos pela correlação simples (tabela 20), indicando relação significativa entre atividade da BChE e genótipos do gene *GHRL*, após ser considerada a relação das variações do sítio -116 do exon 1 do gene *BCHE*, que mostrou que os genótipos com a variante -116A tendem a ter menor atividade dessa enzima. A relação negativa entre -116A e atividade da BChE já era esperada uma vez que o presente estudo utilizou praticamente as mesmas amostras examinadas por Furtado *et. al.* (2008) que encontraram média de atividade da *BChE* menor, quando essa variante está presente tanto em controles como em obesos. O genótipo -116GG; *72LM+MM* apresentou média de atividade da BChE de 8,42 KU/L em 13 obesos e no genótipo -116GG; *72LL* essa média foi de 6,53 KU/L em 98 obesos. O dado novo do presente

trabalho é a relação entre a variante *72M* e atividade mais alta da BChE, mesmo após ser considerada a influência da variante *-116A* do gene *BCHE*.

## 7. CONCLUSÕES

As frequências alélicas e genotípicas, para as variações *A51Q* e *L72M* do gene *GHRL*, parecem ser as primeiras obtidas em amostra do Brasil.

Os presentes dados de frequências não diferiram dos encontrados por Ukkola *et. al.* (2001), exceto os dados quanto ao alelo *51Q*.

Não foi encontrada relação entre o IMC e as variantes *A51Q* e *L72M*.

Não foi encontrada relação entre o alelo *72M* e a idade dos obesos.

Foi encontrada correlação positiva entre a presença do alelo *72M* e a atividade da *BChE*.

Análise de regressão múltipla escalonada mostrou que o alelo *72M* está associado com o aumento da atividade da butirilcolinesterase, após ser considerada a relação das variantes do exon 1 do gene *BCHE* com a atividade dessa enzima

## REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, V. M.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, L. C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum. Biol.**, Detroit, v.73, p. 587-595, 2001.

ALCÂNTARA, V.M. **Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR.** Curitiba, 2000. 230f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ALCÂNTARA, V.M.; CIPRIANI, T.R.; REA, R.; SUPPLY, H.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Formas moleculares da butirilcolinesterase (*BCHE*) e índice de massa corporal (IMC). **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 22, p. 213, 1999. Suplemento.

ANDRADE, F.A., FURTADO, L., SOUZA, R.L.R., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the -116A variant of the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase with body mass index. **Chem. -Biol. Interact.**, Limerick, 2008 (submetido à publicação).

ANTOPOL, W.; TUCHMAN, L.; SCHIFRIN, A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyroidism. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v. 36, p. 45-50, 1937.

AETSINGER, L.S.; CARTER-SU, C.; Mechanism of signaling by growth hormone receptor. **Physio. Rev.**, Baltimore, v. 76, p. 1089-1107, 1996.

ARPAGAU, M.; CHATONNET, A.; MASSON, P.; NEWTON, M.; VAUGHAN, T.A.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 266, p. 6966-6947, 1991.

ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry (Washington)**, v. 29, p. 124-131, 1990.

ARVAT, E.; DI VITO, L.; BROGLIO, F.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F.; DEGHENGHI, R.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. **J. Endocrinol. Invest.**, Milano, v. 23: p. 493–495, 2000.

ARVAT, E.; MACCARIO, M.; DI VITO, L.; BROGLIO, F.; BENSO, A.; GOTTERO, C.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F.; DEGHENGHI, R.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth

hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 86: p. 1169–1174, 2001.

BALDANZI, G.; FILIGHEDDU, N.; CUTRUPI, S.; CATAPANO, F.; BONISSONI, S.; FUBINI, A.; MALAN, D.; BAJ, G.; GRANATA, R.; BROGLIO, F.; PAPOTTI, M.; SURICO, N.; BUSSOLINO, F.; ISGAARD, J.; DEGHENGHI, R.; SINIGAGLIA, F.; PRAT, M.; MUCCIOLI, G.; GHIGO, E.; GRAZIANI, A.; Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 159: p. 1029–1037, 2002.

BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L. e LA DU, B. N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.**, New York, v. 18, p. 6171, 1990.

BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1104-1114, 1992a.

BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1086-10103, 1992b.

BEAUMONT, N.J.; SKINNER, V.O.; TAN, T.M.; RAMESH, B.S.; BYRNE, D.J.; MACCOLL, G.S.; KEEN, J.N.; BOULOUX, P.M.; MIKHAILIDIS, D.P.; BRUCKDORFER, K.R.; VANDERPUMP, M.P.; SRAI, K.S. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 278: p. 8877–8880, 2003.

BEDNAREK, M.A.; FEIGHNER, S.D.; PONG, S.S.; MCKEE, K.K.; HRENIUK, D.L.; SILVA, M.V.; WARREN, V.A.; HOWARD, A.D.; VAN DER PLOEG, L.H.; HECK, J.V. Structure-function studies on the new growth hormone releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 43: p. 4370–4376, 2000.

BENNETT, P.A.; THOMAS, G.B.; HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; van der PLOEG, L.H.; SMITH, R.G.; ROBINSON, I.C. Hypothalamic growth-hormone-secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, p. 4552-4557, 1997.

BERRY, W.T.C.; COWIN, P.J.; DAVIES, D.R. A relationship between body fat and plasma pseudo-cholinesterase. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v. 8, p. 79-82, 1954.



BLALOCK, H. M. **Social statistics**. 2.ed. rev. New York: McGraw-Hill., 1972.

BOWERS, C.Y.; MOMANY, F.; REYNOLDS, G.A.; CHANG, D.; HONG, A.; CHANG, K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. **Endocrinology**, Baltimore, v. 106, p. 663–667, 1980.

BUDOWLE, B.; CHKRABORTY, R.; GIUSTI, A. M. EISENBERG, A. J.; ALLEN, R. C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 48, p. 137-144, 1991.

CALLAHAN, H.S.; CUMMINGS, D.E.; PEPE, M.S.; BREEN, P.A.; MATTHYS, C.C.; WEIGLE, D.S. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 89: p. 1319–1324, 2004.

CASSONI, P.; GHE, C.; MARROCCO, T.; TARABRA, E.; ALLIA, E.; CATAPANO, F.; DEGHENGHI, R.; GHIGO, E.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 150: p. 173–184, 2004.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A., ; PRIMO-PARMO, S. L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M. A. C. ; VIEIRA, M. M. The C<sub>5</sub> isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, Basel, v. 41, p. 330-339, 1991.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Relação entre os fenótipos do loco *CHE2* da colinesterase do soro e o peso individual em duas amostras dos sul do Brasil**. Curitiba. 1989. f. 125. Tese (professor titular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; STUEBER-ODEBRECHT, N.; JUNGE, C.; DE LOURENÇO, M.A.C.; PRIMO-PARMO, S.L.; CARRENHO, J.M.X.; Phenotypes of the *CHE2* locus of serum cholinesterase and adult weight in a sample from Blumenau, Santa Catarina, Brazil. **Rev. Brasil. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 371-376, 1990.

CHEMELLI, R.M.; WILLIE, J.T.; SINTON, C.M.; ELMQUIST, J.K.; SCAMMELL, T.; LEE, C.; RICHARDSON, J.A.; WILLIAMS, S.C.; XIONG, Y.; KISANUKI, Y.; FITCH, T.E.; NAKAZATO, M.; HAMMER, R.E.; SAPER, C.B.; YANAGISAWA, M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. **Cell**, Cambridge, v. 98: p. 437–451, 1999.

COWLEY, M.A.; SMITH, R.G.; DIANO, S.; TSCHOP, M.; PRONCHUK, N.; GROVE, K.L.; STRASBURGER, C.J.; BIDLINGMAIER, M.; ESTERMAN, M.; HEIMAN, M.L.; GARCIA-SEGURA, L.M.; NILLNI, E.A.; MENDEZ, P.; LOW, M.J.; SOTONYI, P.; FRIEDMAN, J.M.; LIU, H.; PINTO, S.; COLMERS, W.F.; CONE, R.D.; HORVATH, T.L. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a

novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. **Neuron.**, Cambridge, v. 37: p. 649–661, 2003.

CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A.; HARAGUS, St. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 22, p. 151-155, 1968.

CUMMINGS, D.E.; FRAYO, R.S.; MARMONIER, C.; AUBERT, R.; CHAPELOT, D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 287: p. E297–E304, 2004.

CUMMINGS, D.E.; PURNELL, J.Q.; FRAYO, R.S.; SCHMIDOVA, K.; WISSE, B.E.; WEIGLE, D.S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes (New York)**, v. 50: p. 1714–1719, 2001.

DATE, Y.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAWAGUCHI, A.; MONDAL, M.S.; SUGANUMA, T.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. **Endocrinology**, Baltimore, v. 141: p. 4255–4261, 2000a.

DATE, Y.; MURAKAMI, N.; KOJIMA, M.; KUROIWA, T.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 275: p. 477–480, 2000b.

DATE, Y.; MURAKAMI, N.; TOSHINAI, K.; MATSUKURA, S.; NIIJIMA, A.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 123: p. 1120–1128, 2002.

DATE, Y.; NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 280: p. 904–907, 2001.

DE VRIESE, C.; GREGOIRE, F.; LEMA-KISOKA, R.; WAELBROECK, M.; ROBBERECHT, P.; DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology**, Baltimore, v. 145, p. 4997-5005, 2004.

DICKSON, S.L.; BAILEY, A.R.; LENG, G.; Growth hormone (GH) secretagogues and neuroendocrine regulation of GH secretion. **Growth Horm. IGF**, v. 9, suppl. A, p. 89-91, 1999.

DORNONVILLE; DE LA COUR, C.; LINDSTROM, E.; NORLEN, P.; HAKANSON, R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. **Regul. Pept.**, Amsterdam, v. 120: p. 23–32, 2004.

ERDMANN, J.; LIPP, L.F.; SCHUSDZIARRA, V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. **Regul. Pept.**, Amsterdam, v. 116: p. 101–107, 2003.

FADEL-PICHETH, C. **Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba**. Curitiba, 1991, 107 p. Tese ( Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

FLIER, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, Cambridge, v. 116: p. 337–350, 2004.

FURTADO, L. **Variabilidade Genética da Butirilcolinesterase e Obesidade**. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

FURTADO, L.; NUNES, K.; MIKAMI, L.R.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the -116A variant of the *BCHE* gene to lower mean butyrylcholinesterase activity. **Chem. -Biol. Interact.**, Lumerick, *no prelo*.

GAFFNEY, D.; CAMPBELL, R.A. A PCR Method to determine the Kalow allele frequency and its significance in the normal population. **J. Med. Genet.**, London, v. 31, p. 248-250, 1994.

GARRY, J.P.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.; FORD, P.C.; JAMES, K.; RUBINSTEIN, H.M. New allele at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, London, v. 13, p. 38-42, 1976.

GNANAPAVAN, S.; KOLA, B.; BUSTIN, S.A.; MORRIS, D.G.; MCGEE, P.; FAIRCLOUGH, P.; BHATTACHARYA, S.; CARPENTER, R.; GROSSMAN, A.B.; KORBONITS, M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 87: p. 2988, 2002.

GOEDDE, H.W.; GEHRING, D.; HOFMAN, R.A. On the problem of a silent gene in pseudocholinesterase polymorphism. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 107, p. 391-93, 1965.

GREENMAN, Y.; GOLANI, N.; GILAD, S.; YARON, M.; LIMOR, R.; STERN, N. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. **Clin. Endocrinol.**, Oxford, v. 60: p. 382–388, 2004.

GUALILLO, O; LAGO, F; CASANUEVA, F; DIEGUEZ, C. One ancestor, several peptides Post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. **Mol. And Cell. Endocrinology**, v 256: p. 1 – 8, 2006.

GUALILLO, O.; CAMINOS, J.; BLANCO, M.; GARCIA-CABALLERO, T.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. **Endocrinology**, Baltimore, v. 142: p. 788–794, 2001.

GUAN, X.M.; YU, H.; PALYHA, O.C.; McKEE, K.K.; FEIGHNER, S.D.; SIRINATHSINGHJI, D.J.; SMITH, R.G.; van der PLOEG, L.H.; HOWARD, A.D. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. **Brain**, Oxford, v. 48, p. 23-29, 1997.

HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to A found in a patient with liver cyrrhosis. **Intern. Med.**, v. 31, p. 357-62, 1992.

HANSEN, T.K.; DALL, R.; HOSODA, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; CHRISTIANSEN, J.S.; JORGENSEN, J.O. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. **Clin. Endocrinol.**, Oxford, v. 56: p. 203–206, 2002.

HAQQ, A.M.; FAROOQI, I.S.; O'RAHILLY, S.; STADLER, D.D.; ROSENFELD, R.G.; PRATT, K.L.; LAFRANCHI, S.H.; PURNELL, J.Q. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 88: p. 174–178, 2003.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1980.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A.; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, London, v.196, p. 1296-98, 1962.

HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; HOPKINSON, D.A. E WHITTAKER, M. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. **Ann. Hum. Genet.**, London, v. 26, p. 359-82, 1963.

HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes. **Nature**, London, v. 191, p. 496-498, 1961.

HIDAKA, K.; IUCHI, I. Determination of gene mutation of silent serum cholinesterase and its epidemiologic characters in the Japanese. **Rinsho Byori**, v. 43, p. 786-91, 1995.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S.L.; LA DU, B.N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Rinsho Byori**, v. 40, p. 535-40, 1992.

HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F.; SCHÄFER, H.; SIEGFRIED, W.; GOLDSCHMIDT, H.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 87(6): p. 2716–2719, 2002.

HOSODA, H.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, Orlando, v. 279:p. 909–913, 2000a.

HOSODA, H.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Purification and characterization of rat des-Q14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, p. 21995–22000, 2000b.

HOSODA, H.; KOJIMA, M.; MIZUSHIMA, T.; SHIMIZU, S.; KANGAWA, K.; Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 278:p. 64–70, 2003.

HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; CULLY, D.F.; ARENA, J.P.; LIBERATOR, P.A.; ROSENBLUM, C.I.; HAMELIN, M.; HRENIUK, D.L.; PALYHA, O.C.; ANDERSON, J.; PARESS, P.S.; DIAZ, C.; CHOU, M.; LIU, K.K.; MCKEE, K.K.; PONG, S.S.; CHAUNG, L.Y.; ELBRECHT, A.; DASHKEVICZ, M.; HEAVENS, R.; RIGBY, M.; SIRINATHSINGHI, D.J.; DEAN, D.C.; MELILLO, D.G.; PATCHETT, A.A.; NAUND, R.; PATRICK, R.G.; DEMARTINO, J.A.; GUPTA, S.K.; SCHAEFFER, J.M.; SMITH, R.G.; VAN DER PLOEG, L.H. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. **Science (Washington)**, v. 273: p. 974–977, 1996.

IZUMI, M.; MAEKAWA, M.; KANNO, T. Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: frequency of allele and associated enzyme activity in serum. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 40, p. 1606-1607, 1994.

JENSEN, F.S.; NIELSEN, L.R.; SCHWARTZ, M. Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. **Hum. Hered.**, New York, v. 46, p. 26-31, 1996.

KALOW, W.; GENEST, K. A Method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, Ottawa, v. 35, p. 339-346, 1957.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterases, as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, Ottawa, v. 35, p. 1305-1320, 1957

KAMEGAI, J.; TAMURA, H.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; SUGIHARA, H.; WAKABAYASHI, I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. **Diabetes (New York)**, v. 50: p. 2438–2443, 2001.

KASINATHAN, C.; GRZELINSKA, E.; OKAZAKI, K.; SLOMIANY, B.L.; SLOMIANY, A. Purification of protein fatty acyltransferase and determination of its distribution and topology. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265: p. 5139–5144, 1990.

KIM, M.S.; YOON, C.Y.; PARK, K.H.; SHIN, C.S.; PARK, K.S.; KIM, S.Y.; CHO, B.Y.; LEE, H.K. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. **Neuroreport**, Oxford, v. 14: p. 1317–1320, 2003.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; NAKAZATO M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, London, v. 402, p. 656-660, 1999.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v.12, p. 118-122, 2001.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physio. Rev.**, New York, v. 85, p. 495-522, 2005.

KORBONITS, M.; CICCARELLI, E.; GHIGO, E.; GROSSMAN, A.B. The growth hormone secretagogue receptor. **Growth Horm. IGF**, v. 9, suppl. A, p. 93-99, 1999.

KORBONITS, M.; GROSSMAN, A.B.; Ghrelin: update on a novel hormone system. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 151, suppl. 2, p. S67-S70, 2004.

KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 13, p. 239-43, 1980.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic Method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 19, p. 5444, 1991.

LI B, STRIBLEY JA, TICU A, XIE W, SCHOPFER LM, HAMMOND P, BRIMIJOIN S, HINRICHS SH, LOCKRIDGE O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 75, p. 1320–1331, 2000.

LIDDELL, J.; LEHMANN, H.; SILK, E. A “silent” pseudocholinesterase gene. **Nature**, London, v. 193, p. 561-562, 1962.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 254, p. 8324-30, 1979.

LU, S.; GUAN, J.L.; WANG, Q.P.; UEHARA, K.; YAMADA, S.; GOTO, N.; DATE, Y.; NAKAZATO, M.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; SHIODA, S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. **Neurosci. Lett.**, v. 321: p. 157–160, 2002.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. **Clin. Chem.**, Orlando, v. 43, p. 924-9, 1997.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M.; ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 235, p. 41-57, 1995.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 988, p. 258-66, 1989.

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In: MASSOULIÉ, J. et al. **Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology**. Washington: American Chemical Society, 1991. p. 42-45.

MASSON, P.; FROMENT, M.T.; BARTELS, C.F.; LOCKRIDGE, O. Asp70 in peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. **Eur. J. Biochem.**, Oslo, v. 235, p. 36-48, 1996.

MATSUMOTO, M.; HOSODA, H.; KITAJIMA, Y.; MOROZUMI, N.; MINAMITAKE, Y.; TANAKA, S.; MATSUO, H.; KOJIMA, M.; HAYASHI, Y.; KANGAWA, K. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 287: p. 142–146, 2001.

MATSUMURA, K.; TSUCHIHASHI, T.; FUJII, K.; ABE, I.; IIDA, M. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. **Hypertension**, Dallas, v. 40: p. 694–699, 2002.

MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 86, p. 953-957, 1989.

McTIERNAN, C.; ADKINS, S.; CHATONNET, A.; VAUGHN, T.A.; BARTELS, C.F.; KOTT, M.; ROSENBERRY, T.L.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Brain cDNA clone for human cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 84, p. 6682-6686, 1987.

MINOKOSHI, Y.; ALQUIER, T.; FURUKAWA, N.; KIM, Y.B.; LEE, A.; XUE, B.; MU, J.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; BIRNBAUM, M.J.; STUCK, B.J.; KAHN, B.B. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, London, v. 428: p. 569–574, 2004.

MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J.; HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 88, p. 11315-19, 1991.

NAGAYA, N. KANGAWA, K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. **Curr. Opin. Pharmacol.**, London, v. 3: p. 146–151, 2003.

NAGAYA, N.; KOJIMA, M.; UEMATSU, M.; YAMAGISHI, M.; HOSODA, H.; OYA, H.; HAYASHI, Y.; KANGAWA, K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 280: p. R1483–R1487, 2001.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, London, v. 409: p. 194–198, 2001.

NOGUEIRAS, R., TSCHOP, M. Biomedicine. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. **Science (Washington)**, v. 310: p. 985–986, 2005.

NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; MCGUIRE, M.C. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 51, p. 821-828, 1992.

NOGUEIRA, C.P.; MCGUIRE, M.C.; GRAESER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117 (GGT->GGAG). **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 46, p. 934-42, 1990.

NUNES, K. **Haplótipos do gene *bche* da butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos**. Curitiba, 2006. 152f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.



PALYHA, O.C.; FEIGHNER, S.D.; TAN, C.P.; MCKEE, K.K.; HRENIUK, DL.; GAO, Y.D.; SCHLEIM, K.D.; YANG, L.; MORRIELLO, G.J.; NAUND, R.; PATCHETT, A.A.; HOWARD, A.D.; SMITH, R.G. Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from Pufferfish to humans. **Mol. Endocrinol.**, Bethesda, v.14: p. 160–169, 2000.

POPOVIC, V.; MILJIC, D.; MICIC, D.; DAMJANOVIC, S.; ARVAT, E.; GHIGO, E.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 88: p. 3450–3453, 2003.

PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 58, p. 52-64, 1996.

QI, X.; REED, J.; ENGLANDER, E.W.; CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A.; GREELEY, G.H. Jr. Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion. **Exp. Biol. Med.**, Maywood, v. 228: p; 1028–1032, 2003.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.  $E_1^K$ , another quantitative variant at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, London, v. 15, p. 27-29, 1978.

RUTER, J.; KOBELT, P.; TEBBE, J.J.; AVSAR, Y.; VEH, R.; WANG, L.; KLAPP, B.F.; WIEDENMANN, B.; TACHE, Y.; MONNIKES, H. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nuclei of the hypothalamus in rats. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 991: p. 26–33, 2003.

SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUJISAWA, T.; MAEDA, M.; IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of a familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 274, p. 159-66, 1998.

SAKATA, I.; YAMAZAKI, M.; INOUE, K.; HAYASHI, Y.; KANGAWA, K.; SAKAI, T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 342: p. 183–186, 2003.

SCOTT, E.M.; WRIGHT, R.C.; A third type of serum cholinesterase deficiency in Eskimos. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 28, p. 253-256, 1976.

SHIBUTA, K.; ABE, M.; SUZUKI, T. A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). **J. Med. Genet.**, London, v. 31: p. 576-579, 1994.

SHIYA, T.; NAKAZATO, M.; MIZUTA, M.; DATE, Y.; MONDAL, M.S.; TANAKA, M.; NOZOE, S.; HOSODA, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 87: p. 240–244, 2002.

SIDELL, F.R.; KAMINSKIS, A.; A temporal intrapersonal physiological variability of cholinesterase activity in human plasma and erythrocytes. **Clin. Chem.**, Orlando, v. 21, p. 1961-1963, 1975.

SIEGEL, J.M. Hypocretin (orexin): role in normal behavior and neuropathology. **Annu. Rev. Psychol.**, Palo Alto, v. 55: p. 125–148, 2004.

SMITH, R.G.; FEIGHNER, S.; PRENDERGAST, K.; GUAN, X.; HOWARD, A. A new orphan receptor involved in pulsatile growth hormone release. **Trends. Endocrinol. Metab.**, New York, v.10: p. 128–135, 1999.

SMITH, R.G.; PONG, S.S.; HICKEY, G.; JACKS, T.; CHENG, K.; LEONARD, R.; COHEN, C.J.; ARENA, J.P.; CHANG, C.H.; DRISKO, J.; WYVRATT, M.; FISHER, M.; NAUND, R.; PATCHETT, A. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. **Recent. Prog. Horm. Res.**, San Diego, v. 51, p. 261-285, 1996.

SMITH, R.G.; van der PLOEG, L.H.; HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; CHENG, K.; HICKEY, G.J.; WYVRATT, M.J.Jr; FISHER, M.H.; NAUNS, R.P.; PATCHETT, A.A.; PeptidomiMic regulation of growth hormone secretion. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 18, p. 621-645, 1997.

SOUZA, R.L.R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C4/5) verificada em eletroforese.** Curitiba, 1995. 74f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA, L.; FREUND, A.A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the Butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian Populations of European and African origin. **Hum. Biol.**, Detroit, v. 70, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R. L. R; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K.V.; FURTADO, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Antropol.**, Washington, v. 326, p. 329-334, 2005a.

SOUZA, R. L. R. ;MIKAMI, L. R.; MAEGAWA R. O. B. ; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, New York, v.84, p. 349-353, 2005b.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1cd.

STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; CARRENHO, J.M.X. Studies on the *CHE1* locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Santa Catarina (Southern Brazil). **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 8, p. 535-543, 1985.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; KANNO, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 29, n. 2, p. 165-69, 1996.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H. E TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 240, p. 372-75, 1997.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. A. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science (Washington)**, v.253, p. 872-878, 1991.

TANAKA, M.; HAYASHIDA, Y.; IGUCHI, T.; AKAN, N.; NAKAI, N.; NAKASHIMA, K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. **Endocrinology**, Baltimore, v. 124, p. 3697-3700, 2001.

TANAKA, M.; NARUO, T.; NAGAI, N.; KUROKI, N.; SHIYA, T.; NAKAZATO, M.; MATSUKURA, S.; NOZOE, S. Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. **J. Psychiatr. Res.**, Oxford, v. 37: p. 17–22, 2003a.

TANAKA, M.; NARUO, T.; YASUHARA, D.; TATEBE, Y.; NAGAI, N.; SHIYA, T.; NAKAZATO, M.; MATSUKURA, S.; NOZOE, S. Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. **Psychoneuroendocrinology**, London, v. 28: p. 829–835, 2003b.

TOSHINAI, K.; DATE, Y.; MURAKAMI, N.; SHIMADA, M.; MONDAL, M.S.; SHIMBARA, T.; GUAN, J.L.; WANG, Q.P.; FUNAHASHI, H.; SAKURAI, T.; SHIODA, S.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. **Endocrinology**, Baltimore, v. 144: p. 1506–1512, 2003.

TSCHÖP, M.; DAVID, L.; SMILEY, D.L.; HEIMAN, L.M. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, London, v. 407, p. 908-913, 2000.

TSCHÖP, M.; WEYER, C.; TATARANNI, P.A.; DEVANARAYAN, V.; RAVUSSIN, E.; HEIMAN, M.L. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. **Diabetes (New York)**, v. 50: p. 707–709, 2001.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E.E.; CHAGNON, M.; SJÖSTRÖM, L.; BOUCHARD, C.; Mutations in the Preproghrelin / ghrelin gene associated with obesity in human. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 86, n.8, p. 3996-3999, 2001.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, Antwerpen, v. 53, p. 633-44, 1973.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, London, v. 35, p. 174-97, 1980.

YAMANAKA, A.; BEUCKMANN, C.T.; WILLIE, J.T.; HARA, J.; TSUJINO, N.; MIEDA, M.; TOMINAGA, M.; YAGAMI, K.; SUGIYAMA, F.; GOTO, K.; YANAGISAWA, M.; SAKURAI, T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. **Neuron.**, v. 38: p. 701–713, 2003.

ZHANG, J.V., REN, P.G., AVSIAN-KRETCHMER, O., LUO, C.W., RAUCH, R., KLEIN, C., HSUEH, A.J. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. **Science(Washington)**, v. 310: p. 996–999, 2005.

Disponível em: <[http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap\\_B35/?name=chr3:1036457..1036457](http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B35/?name=chr3:1036457..1036457)> acessado em 19/02/2008.

Disponível em: <[H:\Reference SNP\(refSNP\) Cluster Report rs34911341.htm](H:\Reference SNP(refSNP) Cluster Report rs34911341.htm)> acessado em 19/02/2008